



**Universidade de
Aveiro
Ano 2012**

Departamento de Biologia

**ALEXANDRA MARIA
DE OLIVEIRA REGO**

**A CROMOGRANINA A NA INSUFICIÊNCIA
CARDÍACA**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2012

**ALEXANDRA MARIA
DE OLIVEIRA REGO**

A CROMOGRANINA A NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João Tiago de Sousa Pinto Guimarães, Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e co-orientação da Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, Professora Associada com Agregação, Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Professora Doutora Maria de Lurdes Gomes Pereira
Professor Associado com Agregação, Universidade de Aveiro

Prof. Doutor José Paulo Araújo Figueiredo
Professor Auxiliar Convidado da Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

Professor Doutor João Tiago de Sousa Pinto Guimarães
Professor Associado da Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos
Professor Associado com Agregação, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao meu orientador Professor Doutor João Tiago Guimarães pelas suas pertinentes observações para a realização deste trabalho, por me ter dado a oportunidade de aprender com este tema e pelo privilégio de me ter aceite como sua orientanda.

À minha co-orientadora Professora Doutora Conceição Santos pelo incentivo, confiança e disponibilidade.

Ao Cláudio Reis por ter sido sempre um excelente colega.

Às minhas colegas de trabalho pela colaboração.

Ao meu marido e ao meu filho pelo apoio e compreensão.

palavras-chave

Insuficiência Cardíaca (IC); Cromogranina A (CgA); *B-type Natriuretic Peptide* (BNP); Proteína C Reactiva de Alta Sensibilidade (asPCR); Radioimunoensaio (RIA); *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

resumo

A Cromogranina A (CgA) é o membro principal de uma família de glicoproteínas ácidas secretoras, as graninas, que são essencialmente expressas nas células endócrinas e neuroendócrinas. Desempenha várias funções no processo secretor, intracelularmente como regulador chave da biogénese dos grânulos de secreção e extra-celularmente pela formação de péptidos biologicamente activos como resultado do processamento proteolítico de graninas reguladoras de secreção hormonal.

A ampla distribuição da CgA, fez da sua medição imunoreactiva na circulação, uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de neoplasia neuroendócrina, e mais recentemente como um biomarcador promissor para uso na Insuficiência Cardíaca (IC), capaz de avaliar a actividade do sistema nervoso simpático.

A IC é uma falência da capacidade do coração bombear a quantidade de sangue biologicamente necessária, colocando em risco o retorno venoso e as necessidades metabólicas do organismo. Como complemento da clínica, parte da avaliação da IC está associada com a disponibilidade de biomarcadores específicos, que contribuam para rastreio, diagnóstico, estratificação do risco, avaliação prognóstica e monitorização da terapêutica. É exemplo a medição do marcador *B-type Natriuretic Peptide* (BNP) e dos peptídeos relacionados.

Vários recursos práticos podem contribuir para a eleição da CgA como novo biomarcador cardíaco, pois é pouco propensa a rápidas flutuações, o que simplifica tanto a colheita de sangue como a fase pré-analítica. Tem ainda características vantajosas na sua análise bioquímica, pois pode ser facilmente realizada por métodos muito sensíveis, padronizados e validados, como Radioimunoensaio (RIA) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

No entanto o conhecimento de que a CgA está sujeita a diversas modificações moleculares pós-traducionais e proteolíticas de processamento que podem variar de tecido para tecido, torna-a um antígeno altamente heterogéneo, levando a que diferentes anticorpos/reagentes a possam detectar com diferentes eficiências. Este é um ponto importante a ter em consideração quando se comparam os resultados obtidos com diferentes ensaios.

Existem questões pertinentes que se levantam relativamente à dificuldade de comparação de resultados pelos métodos citados, como o facto de poderem diferir no anticorpo específico contra a CgA, nas unidades utilizadas, nos valores de referência, na regras de colheita e conservação da amostra, etc. Há por isso necessidade de se apostar em mais trabalhos científicos que revelem quais os métodos laboratoriais mais vantajosos para a determinação CgA no contexto de IC, e que simultaneamente caminhem no sentido de uma futura uniformização universal de um método de detecção.

keywords

Heart failure (HF); Chromogranin A (CgA), B-type Natriuretic Peptide (BNP), High Sensitivity C-Reactive Protein (hsPCR); Radioimmunoassay (RIA), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

abstract

The Chromogranin A (CgA) is the principal member of a family of acidic secretory glycoproteins, the granins, which are expressed in endocrine and neuroendocrine cells. It performs several functions in the secretory process, intracellularly it targets peptide hormones and neurotransmitters for the granules of the regulated secretory pathway, and extra-cellularly by the formation of biologically active peptides as a result of proteolytic processing of granins that regulate hormone secretion.

The wide distribution of CgA made the measurement of immunoreactive CgA in circulation, an important tool for the diagnosis of neuroendocrine neoplasia, and more recently as a promising biomarker for use in heart failure (HF), which can evaluate the activity of the sympathetic nervous system.

The HF is a failure of the heart's ability to pump the amount of blood that is biologically necessary, endangering venous return and metabolic needs of the body. The complementing of clinical part in HF evaluation, is associated with the availability of specific biomarkers that contribute to screening, diagnosis, risk stratification, prognostic and therapeutic drug monitoring. One example is the measurement of the biomarker B-type Natriuretic Peptide (BNP) and related peptides.

Several practical resources can contribute to the election of CgA as new cardiac biomarker such as its low tendency to rapid fluctuations in relation to BNP, which simplifies both, the blood sample as preanalytical phase. It has further advantageous characteristics concerning its biochemical analysis since it can readily be performed by methods very sensitive, standardized and validated, as radioimmunoassay (RIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

There is however knowledge that CgA is subject to various molecular posttranslational and proteolytic modifications of its processing which may be different from tissue to tissue which. It makes CgA a highly heterogeneous antigen, and leads to the conclusion that different antibodies / reagents may detect CgA with different efficiencies. This is an important point to consider when comparing the results obtained with different assays.

There are pertinent questions that arise regarding the difficulty of comparing results by the methods cited, such as the fact that they can differ in specific antibody against CgA, the units used in the reference values, the sample collection rules and preservation, among others. Future studies should therefore show what laboratory methods are the most advantageous for CgA determination in HF context, and also point in the direction of a future standardization for a detection method.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VI
1. INTRODUÇÃO	V
1.1. A Cromogranina A	3
1.1.1. Cromogranina A e a Célula Cromafim	4
1.1.2. Actividade Biológica e Fisiológica da CgA	7
1.2. Insuficiência Cardíaca	9
1.2.1. Inflamação, sistema neuro-hormonal e função renal na Insuficiência Cardíaca	12
1.2.2. Biomarcadores na Insuficiência Cardíaca	14
1.2.2.1. Proteína C-Reactiva de alta sensibilidade (asPCR)	16
1.2.2.2. Péptido natriurético do tipo B (BNP)	18
1.3. A Cromogranina A na Insuficiência Cardíaca	20
1.4. Análise da Cromogranina A por Métodos Imunoquímicos	24
1.4.1. Radioimunoensaio (RIA)	25
1.4.1.1. RIA na quantificação da Cromogranina A	27
1.4.2. Ensaio Imunoradiométrico (IRMA)	30
1.4.3. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA)	31
1.4.3.1. ELISA na quantificação da CgA	34
1.5. Objectivos	36
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	37
2.1. Material e Métodos	39
2.2. Resultados	40
3 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	47
4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - A glicoproteína CgA, locais de clivagem e péptidos derivados (figura adaptada e traduzida de *Kronenberg H. et al, Williams Textbook of Endocrinology*, 2005, 11th edition).....4

Figura 1.2 - Regulação Autócrina/ Parácrina pela Catestatina, da libertação de Catecolaminas e CgA a partir de Células Cromafins. A acetilcolina liga-se ao agonista do receptor nicotínico, desencadeando influxo de sódio e consequente despolarização da membrana, o que activa o influxo de cálcio através de canais dependentes da voltagem e conduz à libertação do conteúdo dos grânulos cromafins por exocitose. Após a libertação do conteúdo, a catestatina exerce um potente efeito antagónico na sinalização colinérgica nicotínica, resultando num *feedback* negativo da libertação de catecolaminas. As setas com sinais de adição indicam estimulação, e a seta com um sinal menos, inibição (traduzido e adaptado de *Taupenot et al*, 2003).....6

Figura 1.3 - Síntese e secreção do BNP.....19

Figura 1.4- Representação esquemática de alguns eventos que caracterizam a Insuficiência Cardíaca, indicando os locais possíveis para a intervenção da CgA e seus péptidos derivados (traduzido e adaptado de *Angelone et al*, 2012).....21

Figura 1.5 - Esquema da técnica de Radioimunoensaio (RIA), com recurso ao anticorpo secundário (traduzido e adaptado de:
<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/Radioimmunoassay.html>.....
.....28

Figura 1.6 - Esquema de uma curva padrão de RIA para detecção de CgA.....29

Figura 1.7 Esquemas de uma técnica IRMA e respectiva curva de calibração (traduzida e adaptada da bula do *kit* CGA-RIACT, Fardiotop).....30

Figura 1.8 – Figura esquemática de uma ELISA sandwich para detecção de CgA.....35

Figura 1.9 - Exemplo de uma curva-padrão, construída a partir da densidade óptica (DO) dos padrões (eixo dos yy, linear) em função da sua concentração (eixo dos xx, logarítmico), quer em papel gráfico semi-logarítmico quer usando um método computadorizado. A concentração das amostras pode ser lida directamente a partir da curva de calibração.....35

Figura 3.1 - Concentrações medidas em plasma-EDTA, plasma heparina e no soro de grupo voluntário saudável pelos *kits* CiSRIA e CISELISA, (adaptado de Glinicki 2010).....55

Figura 3.2 - Representação esquemática da molécula Cg A e epitopos contra os quais os anticorpos foram criados para os ensaios SAS, CISELISA, DAKO e EDRIA (*Ramachandran et al, 2012*).....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Principais péptidos derivados da CgA, respectiva fracção e actividade biológica.....	8
Tabela 1.2 – Classificação de NYHA.....	12
Tabela 2.1 - Características dos ensaios (<i>kits</i>) disponíveis comercialmente mais utilizados para determinação da concentração de CgA pelo método ELISA: valores de referência, colheita, conservação da amostra, anticorpos específicos, fragmento de CgA contra o qual é produzido o anticorpo específico.....	41
Tabela 2.2 - Características dos ensaios (<i>kits</i>) disponíveis comercialmente mais utilizados para determinação da concentração de CgA pelo método RIA/IRMA: valores de referência, colheita, conservação da amostra, anticorpos específicos, fragmento de CgA contra o qual é produzido o anticorpo específico.....	42
Tabela 2.3 - Resumo de alguns estudos que abordam a quantificação da CgA pelos métodos RIA/IRMA e ELISA, e que têm por objectivo específico a comparação de métodos ou a importância da CgA como marcador de diagnóstico em várias patologias: autor e ano de publicação, número de participantes no estudo, colheita e armazenamento da amostra, técnicas utilizadas para quantificação da CgA e principais conclusões dos estudos.....	43
Tabela 3.1 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (V.P.P.), valor preditivo negativo (V.P.N.) e <i>cut-off</i> para os 3 <i>kits</i> comerciais estudados por <i>Stridsberg et al, 2003</i>	52
Tabela 3.2 - Sensibilidade, especificidade e <i>Cut-off</i> encontrados para diferenciação entre o grupo controlo e participantes com doença activa, diferenciação entre TNE com e sem metástases (valores desenvolvidos por <i>Zatelli, 2007</i>).....	52

Abreviaturas

ANP- Péptido natriurético do tipo A (do inglês, *A-type natriuretic peptide*).

ATP - Adenosina Trifosfato.

ATPase- Enzima Adenosina Trifosfato.

asPCR- Proteína C-Reativa de alta sensibilidade.

BNP - Péptido natriurético do tipo B (do inglês, *B-type natriuretic peptide*).

CgA - Cromogranina A.

CISELISA – Kit Chromoa ELISA; *CIS Bio International*, Gif-sur-Yvette cedex, França.

CNP - Péptido natriurético do tipo C (do inglês, *C-type natriuretic peptide*)

CP – Cancro da Próstata

CPM –Contagem por minuto (do inglês, *Counts per minute*)

CT scan - *computerized tomography*

DAKOELISA – Kit DAKO Chromogranina A ELISA kit; DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca.

DIAELISA – Kit Hu Chromogranina A – ELISA, *DIAsource ImmunoAssays S.A.*, Bélgica.

EIA - Enzima-imunoensaio

IBLLELISA – Kit Chromogranin A RIA; *IBL International GMBH*, Hamburg, Alemanha.

IBLRIA – Kit Chromogranin A ELISA; *IBL International GMBH*, Hamburg, Alemanha.

IC - Insuficiência Cardíaca.

ICC - Insuficiência cardíaca crónica.

IL6 – Interleucina 6.

ECG – Eletrocardiograma.

EDRIA –Kit CgA RIA (Ref:RB 321); EuroDiagnostica, Malmö,Suécia.

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético.

ELISA – Ensaio de imunoadsorção enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*).

ERAC – Grupo europeu de Radioimunoensaios (do inglês, *European Radioimmunoassay Club*)

FA – Fosfatase Alcalina

eGFR – Filtração Glomerular Estimada.

GEP – Tumor Neuroendócrino Gastropancreático

HBP - Hiperplasia Benigna da Próstata

HDL – Lipoproteína de alta densidade (do inglês, *High density lipoprotein*).

IgG – Imunoglobulina G.

IRMA – ensaio imunorradiométrico

kDa – Medida internacional Quilo Dalton.

NSB – Contagem Radioactiva do Branco

NYHA - *New York Heart Association*

NT-proBNP – Prohormona N-terminal do Péptido natriurético tipo B (do inglês, *N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide*).

OD – Densidade Ótica (do inglês *Optic Density*).

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR – Proteína C-Reativa

PRR – Peróxidase de Rábano

PST - Pancreastatina

PVC – Cloreto de Polivinil

RAA - Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

RER – Reticulo Endoplasmático Rugoso.

RIA - Radioimunoensaio (do inglês *Radioimmunoassay*).

RIACIS – Kit CGA-RIA CT; *CIS Bio International*, Gif-sur-Yvette cedex, França.

RIAFARD – Kit CGA-RIACT, Fardiotop

TMB - Tetrametilbenzidina

TNE – Tumor Neuroendócrino

TNF- α - Factor de Necrose Tumoral- α .

TNFRs – Receptor do Factor de Necrose Tumoral- α .

Trop I – Troponina Cardíaca Específica I

V.P.N. – Valor Preditivo Negativo

V.P.P. – Valor Preditivo Positivo

1- INTRODUÇÃO

1.1. A Cromogranina A

A Cromogranina A (CgA) é uma glicoproteína ácida, de 439 aminoácidos e peso molecular de 48 kDa, cujo gene está localizado no cromossoma 14 (GLINICKI, 2010).

Pertence a uma família de proteínas secretoras que existem armazenadas principalmente nos grânulos do núcleo denso das células da medula suprarenal, células cromafins, e também em muitas outras células neuroendócrinas, em gânglios do sistema nervoso simpático e em grânulos secretores de outras células peptidérgicas (JANSSON, 2009).

Esta proteína foi originalmente identificada como a principal proteína solúvel dos grânulos de secreção das células cromafins, e é co-excretada com as catecolaminas mediante estimulação da medula suprarenal (HELLE, 2002). Mais tarde, foi descoberto que a CgA é membro de uma família de proteínas secretoras ácido-solúveis, as graninas, que inclui além daquela, a cromogranina B e a secretogranina entre outras (VILLABONA, 2008).

Estudos de caracterização de DNA e proteínas, mostram que a CgA humana é uma proteína O-glicosilada, sulfatada e fosforilada (CORTI, 2004). A sua estrutura primária contém vários pares de aminoácidos básicos que representam sítios de clivagem proteolítica, para a formação de um grande número de péptidos biologicamente activos, como as vasostatinas, cromostatinas, pancreastatina, catestatina entre outros (MAZZA, 2010) (figura 1.1).

A proteólise da CgA tem lugar tanto num tecido específico dentro dos grânulos secretores, como no espaço extracelular após a sua secreção, e é importante para o processamento proteolítico específico dos tecidos (WOLLERT, 2002).

As propriedades mais relevantes da CgA, incluem uma dupla função, tanto como proteínas para armazenamento hormonal e granulogénese, como pró-hormona reguladora da biossíntese de péptidos e aminas (HELLE, 2002). A CgA também pode exercer várias outras funções inclusivamente metabólicas e endócrinas, podendo actuar também como uma hormona polivalente (WOLLERT, 2002).

Considerações teóricas sugerem que a CgA não é apenas um marcador de actividade neuroendócrina e reguladora do sistema metabólico endócrino e imunitário, mas também pode por si própria exercer acções nocivas no miocárdio e

afectar a biologia do tumor (CECONI, 2001 & PIERONI, 2007). Alguns estudos recentes observaram que a CgA pode apresentar múltiplas formas com diferentes tamanhos hidrodinâmicos de 600 kDa, 100 kDa e 55 kDa, detectadas no soro de doentes cancerosos.

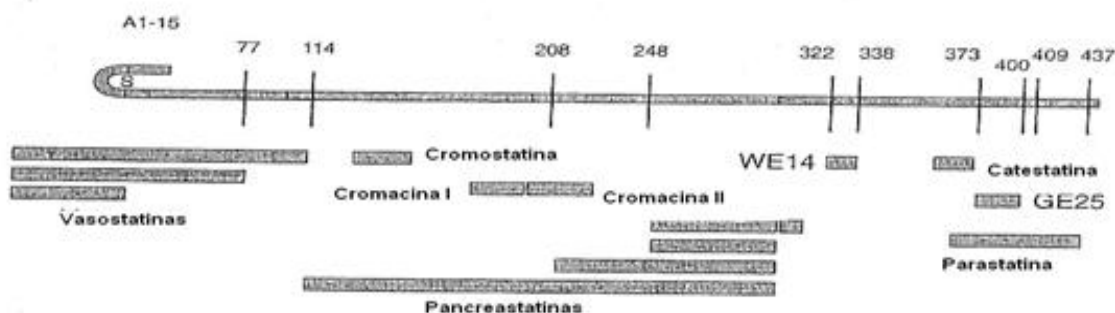


Figura 1.1 - A glicoproteína CgA, locais de clivagem e péptidos derivados (figura adaptada e traduzida de Kronenberg H. et al, *Williams Textbook of Endocrinology*, 2005, 11th edition).

A CgA é geralmente detectada em fluidos biológicos e em tecidos utilizando diferentes testes imunológicas (radioimunoensaio, imunoadsorção enzimática, *Western Blotting*, imunofluorescência, imuno-histoquímica, e outras). A CgA está sujeita a diversas modificações pós-traducionais e proteolíticas de processamento que podem variar de tecido para tecido. Assim, do ponto de vista analítico, é um antígeno altamente heterogéneo, não sendo portanto surpreendente, que diferentes anticorpos a possam detectar com diferentes eficiências. Este é um ponto importante a ter em consideração, quando se comparam os resultados obtidos com diferentes ensaios (CORTI, 2004 & STRIDSBERG, 2003).

1.1.1. Cromogranina A e a Célula Cromafim

As células cromafins dispõem-se em cordões em redor dos capilares sanguíneos na medula da supra-renal e o seu nome “cromafim” baseia-se na cor amarelo-acastanhado que estas células adquirem quando sujeitas a fixação com agentes que contem ácido crómico. (HELLE, 2002).

A CgA, as proteínas granulares e os péptidos pro-hormonais são sintetizados conjuntamente no retículo endoplasmático rugoso. Estes produtos são posteriormente

transportados para o Complexo de Golgi para serem empacotados em grânulos pró-secretores, grânulos esses que são formados pelas proteínas da via secretória regulada como as graninas, prohormonas e neuropéptidos. São grânulos secretórios imaturos, um intermédio vesicular de vida curta, sendo essa forma intermédia sujeita a um complexo processo de maturação que inclui a fusão entre grânulos imaturos e a formação de vesículas derivadas destes, contendo matéria não integrante dos grânulos secretórios maduros. É nestes grânulos maduros, grânulos cromafins, que são armazenadas as proteínas de secreção regulada que são vesículas electrodensas com um diâmetro de 50 a 350 nm, e que contêm no seu interior moléculas pequenas e proteínas. Porém, em termos moleculares, as catecolaminas são as moléculas mais abundantes seguidas de adenosina trifosfato (ATP), ácido ascórbico, cálcio e graninas. (KRONENBERG, 2007). As graninas têm como principal função a agregação do conteúdo dos grânulos, condensando os seus constituintes e aumentando assim a eficiência da capacidade de armazenamento dos grânulos secretórios. A agregação é mediada por concentrações moderadamente altas de cálcio e um pH moderadamente ácido. Os constituintes dos grânulos cromafins criam no seu interior, relativamente ao citoplasma, uma elevada pressão osmótica intragranular (TAUPENOT, 2003).

O funcionamento do grânulo está dependente duma ATPase que mantém o gradiente electroquímico, dado que a membrana do grânulo é de baixa permeabilidade iónica. Embora essencial, o gradiente iónico não é suficiente para explicar a captação das catecolaminas, a formação de grânulos nem o armazenamento de catecolaminas em elevadas quantidades que está dependente da função da cromogranina A (HELLE, 2002). O armazenamento das catecolaminas nos grânulos cromafins é mantido por síntese e captação activa do citosol, que as guarda sob a forma de um complexo intragranular mal caracterizado. Embora ainda não se tenham identificado os locais de ligação de catecolaminas e ATP à CgA, é consensual que a interacção entre essas substâncias seja inespecífica e baseada na atracção de cargas electrostáticas (HELLE, 2002).

A CgA e o ATP promovem a agregação passiva das substâncias solúveis do grânulo, formando aquilo a que se chama a “matriz intragranular”. No entanto, a interacção entre a CgA e as catecolaminas não é exclusivamente do tipo simples e passivo, já que a activação por mensageiros de vias secundárias poderá modular esta interacção, produzindo um abrandamento ou aceleração do processo exocítico

(KRONENBERG, 2007). A libertação da CgA, catecolaminas e outras proteínas para o tecido extra-celular é feita por exocitose, e o principal estímulo fisiológico para a sua libertação das células cromafins, é a acetilcolina que tem origem na medula espinal, e é transmitido às células cromafins através de neurónios simpáticos. Estes neurónios apresentam um longo axónio que viaja pelo nervo esplâncnico e liberta acetilcolina que se liga ao receptor nicotínico da célula cromafim induzindo a sua despolarização e aumentando a permeabilidade ao cálcio.

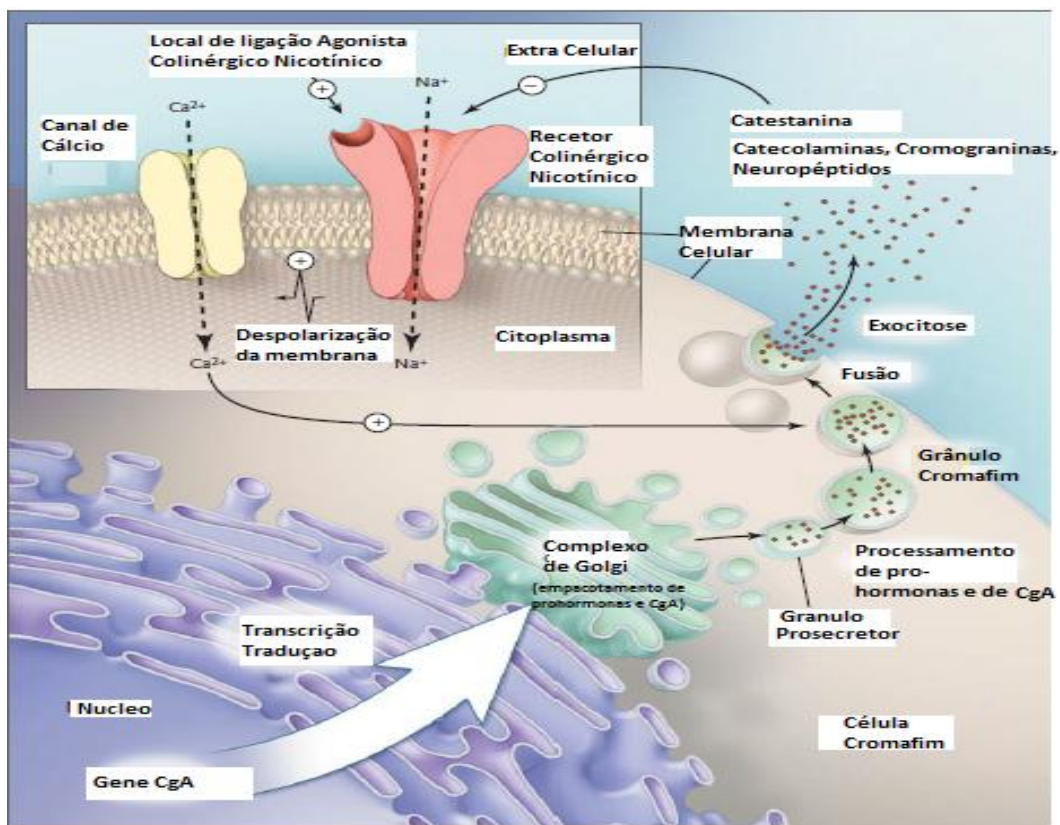


Figura 1.2 - Regulação Autócrina/ Parácrina pela Catestatina, da libertação de Catecolaminas e CgA a partir de Células Cromafins. A acetilcolina liga-se ao agonista do receptor nicotínico, desencadeando influxo de sódio e consequente despolarização da membrana, o que activa o influxo de cálcio através de canais dependentes da voltagem e conduz à libertação do conteúdo dos grânulos cromafins por exocitose. Após a libertação do conteúdo, a catestatina exerce um potente efeito antagónico na sinalização colinérgica nicotínica, resultando num *feedback* negativo da libertação de catecolaminas. As setas com sinais de adição indicam estimulação, e a seta com um sinal menos, inibição (traduzido e adaptado de *Taupenot et al*, 2003).

O aumento do cálcio intracelular inicia a secreção de catecolaminas, o que envolve como consequência a excreção do conteúdo solúvel do grânulo cromafim, incluindo as cromograninas para o espaço extracelular. Durante este processo, a componente insolúvel do grânulo cromafim – essencialmente a parede celular do grânulo – permanece na célula cromafim (HELLE, 2002).

A exocitose pode tratar-se dum processo em que se dá a fusão completa da vesícula exocítica ou de uma fusão tipo “*kiss and run*”, em que apenas uma parte da vesícula se funde com a membrana celular, formando um poro de fusão, podendo libertar-se todo o conteúdo da vesícula (HELLE, 2002).

Entre outros processos, o complexo catecolaminas/CgA interfere com a exocitose. A cinética exocítica pode ser modulada por dissociação entre cromograninas e catecolaminas e por aumento das concentrações de cálcio extracelular (TAUPENOT, 2003).

Por sua vez, a Catestatina, um dos fragmentos de CgA, inibe a libertação de catecolaminas das células cromafins ao ligar-se ao receptor neuronal colinérgico nicotínico, o qual é o indutor fisiológico para a secreção. A Catestatina também evita a dessensibilização da libertação de catecolaminas a partir de células cromafins, que é induzida por repetida estimulação nicotínico-agonista. Assim, Catestatina contribui para um mecanismo autócrino de *feedback* negativo que modula a libertação de catecolaminas dentro do sistema simpatoadrenal. Desde que o excesso de actividade simpática tem sido relacionado com desenvolvimento da hipertensão, uma perturbação do mecanismo da catestatina pode ser considerado um factor contribuinte. Estudos recentes mostram que o nível plasmático da Catestatina está diminuído em doentes com hipertensão (figura 1.2) (TAUPENOT, 2003).

1.1.2. Actividade Biológica e Fisiológica da CgA

A CgA participa em inúmeros processos biológicos, fisiológicos e patológicos e as suas actividades autocrinas, parácrinas e endócrinas têm sido demonstradas (ANGELONE, 2012). Na tabela 1.1, encontram-se representados os principais péptidos derivados da CgA e respectiva função. Além da actividade da Catestatina exposta anteriormente, também outros fragmentos exercem diversas actividades biológicas: i) A Cromostatina afecta a actividade dos canais de cálcio das células

cromafins, mas não altera os fluxos de sódio. Aumenta a dessensibilização de respostas das células e altera a cinética da libertação de catecolaminas. Este péptido (CgA 124–143) é gerado a partir CgA extracelularmente através de um mecanismo proteolítico dependente de cálcio, pelo que pode ser considerado um modulador de respostas associadas a catecolaminas (HELLE, 2002).

ii) A Vasostatina I e II, respectivamente os fragmentos CgA 1-76 e CgA 1-113, inibem a vasoconstrição mediada por agonistas adrenérgicos. Para além de inibir a vasoconstrição, a infusão exógena de vasostatina produz efeitos significativos inotrópicos negativos e acções lusitrópicas em modelos animais (MAZZA, 2010).

Tabela 1.1 - Principais péptidos derivados da CgA, respectiva fracção e actividade biológica.

<i>Péptido derivado de CgA</i>	<i>Fracção de CgA</i>	<i>Actividade biológica</i>
Cromostatina	CgA 124–143	Receptores que controlam a actividade dos canais de cálcio das células cromafins (LOH, 2012)
Vasostatinas	Fragmento N-terminal CgA 1-76 e CgA 1-113	Regulador homeostático do sistema cardiovascular (Mazza, 2010)
Cromacinas (I e II)	CgA 176–197; CgA 1–40	Expressas em tumores da pituitária. Actividade Antimicrobiana (Helle, 2004)
Catestatinas	CgA 352-372	Inibidor não competitivo da produção de catecolaminas (Cheng, 2010)
Pancreastatina	CgA 250–301	Regulador da acção da insulina (Cheng, 2010)
Parastatina	CgA 347-419	Inibidor de secreções das células da paratiróide (Dunn, 2002)
Serpinina	Fragmento C-terminal	Regulador β -adrenérgico inotrópico e lusitrópico (Tota B, 2012)

iii) A Cromacina I e II, correspondentes aos fragmentos CgA 176–197 e CgA 1–40, são expressas em alta percentagem na maioria dos tumores benignos e malignos da pituitária. Também podem exercer actividade antimicrobiana. (HELLE, 2004).

iv) A Pancreastatina (PST) tem um efeito inibidor generalizado sobre a secreção em muitos sistemas exócrinos e endócrinos, desempenhando um papel de contra-regulação da acção da insulina pelos seus efeitos sobre o metabolismo da glicose e lípidos no fígado e no tecido adiposo. Além disso, tem sido proposto que a PST actua também no átrio cardíaco, pois é uma hormona dependente de cálcio, e o aumento dos seus níveis plasmáticos na hipertensão essencial parecem estar correlacionados com as catecolaminas, o que levanta a hipótese de poder existir uma interacção na sinalização em membranas do coração. Estes dados sugerem que a PST pode modular a função cardíaca (YANES, 2001). v) A Parastatina é um Inibidor de secreções das células da paratiróide (DUNN, 2002). vi) A Serpinina, o fragmento mais recentemente descoberto, é derivada da clivagem de uma porção C-terminal da CgA e é um indutor da expressão da protease PN1 nas células neuroendócrinas. É também um regulador β -adrenérgico lusitrópico e inotrópico o que sugere que possa ter um papel na forma como o miocárdio responde á estimulação simpática das células cromafins (TOTA, 2012).

1.2. Insuficiência Cardíaca

A doença cardiovascular emergiu como uma proeminente causa de morbilidade e mortalidade na população adulta ocidental, representando uma causa *major* de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 17 milhões de pessoas morrem todos os anos com uma doença cardiovascular, representando 30% de todas as causas de morte. A doença cardiovascular caracteriza-se por múltiplos e progressivos eventos fisiopatológicos que podem conduzir à disfunção cardíaca, fibrose intersticial, dilatação ventricular, arritmias e por fim morte (ANGELONE, 2012). Dentro das patologias cardiovasculares, a Insuficiência Cardíaca (IC) caracteriza-se por uma síndrome resultante de uma alteração estrutural ou funcional do coração, na qual este não tem capacidade para bombear sangue a uma taxa compatível com as exigências do corpo, ou pode fazê-lo apenas a partir de uma pressão elevada de enchimento

(BERGAMINI, 2009). Estima-se que mais de 20 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de IC, e vários estudos têm documentado o aumento da incidência da mesma, com o aumento da idade. De acordo com um relatório da *American Heart Association*, a incidência de IC aproxima-se de 10 em 1000 pessoas com idade superior a 65 anos (ROGER, 2011).

A IC pode ser dividida em disfunção sistólica e disfunção diastólica. A IC sistólica é a mais comum, correspondendo a 70% dos casos de IC e surge de um compromisso da contratilidade do coração levando a uma diminuição do volume de ejeção, dilatação cardíaca e elevação da pressão diastólica do ventrículo esquerdo. Em contraste, a disfunção diastólica interfere com a capacidade do coração relaxar adequadamente e encher de sangue (SANDERSON & TAN, 2010). Com base no tempo de apresentação e na gravidade dos sinais e sintomas, a IC pode ser classificada nas formas aguda e crônica (GRADIZ, 2007).

A etiologia desta patologia é diversa, e em termos práticos são consideradas causas de IC esquerda e causas de IC direita. Na IC esquerda as causas mais comuns são a doença cardíaca isquêmica, a hipertensão arterial, as doenças valvulares aórtica e mitral, as miocardites, a amiloidose cardíaca e estados de alto débito. Relativamente às principais causas da IC direita constam a IC esquerda, a doença pulmonar crônica, a estenose valvular pulmonar, a doença valvular tricúspide, a doença cardíaca congênita, a hipertensão pulmonar entre outras (KASPER, 2006).

Fisiologicamente, a função ventricular depende da interação de quatro fatores, a contratilidade cardíaca, a pré-carga, a pós-carga e a frequência cardíaca. Ao longo dos últimos anos, tem havido um desafio constante no sentido de determinar o carácter multifacetado e a progressão multissistêmica inerentes à IC, dado que é uma patologia que envolve alterações em diversos sistemas homeostáticos. Uma vez originada no coração, estende a sua influência para muitos outros locais extracardíacos (TORRE-AMIONE, 2005). Esses processos fisiopatológicos englobam caminhos metabólicos distintos, mas que se interligam e interagem entre si, concorrendo para perpetuar e fazer avançar a falência e remodelação cardíaca, a caquexia esquelética e a disfunção endotelial que se tornam marcas das formas mais avançadas da doença. Mesmo nas formas mais discretas e ainda incipientes de IC, essas alterações já estão presentes e têm sido recentemente avaliadas como

potenciais indicadores de diagnóstico precoce, podendo servir como sinalizadores de risco e prognóstico (HUNT, 2005)

Na fisiopatologia da IC verifica-se que em resposta a uma diminuição das funções desempenhadas por factores de homeostasia cardíaca, o organismo vai activar mecanismos de compensação na tentativa de manter uma perfusão tecidual adequada. Estes mecanismos incluem a estimulação do sistema nervoso simpático, a activação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA) e a vasorregulação local. Assim, na IC esta activação neuroendócrina é principalmente reflectida pelo aumento de catecolaminas, componentes do sistema RAA e peptídeos natriuréticos (DIEPLINGER, 2009). Embora benéficos numa fase inicial, estes mecanismos de compensação podem ter um efeito prejudicial que se traduz por uma remodelação do ventrículo esquerdo associada ao aumento excessivo do consumo de oxigénio pelo miocárdio, conduzindo a uma deterioração secundária da função cardíaca (RADIZ, 2007).

As consequências da IC surgem por diminuição do débito cardíaco, por acumulação do retorno venoso no coração (dilatação cardíaca, nos pulmões edema pulmonar), ou nos tecidos periféricos (edema periférico).

Para responder à necessidade de categorizar os doentes com IC, quer para usar em ensaios clínicos, quer para avaliar resposta ao tratamento por parte do clínico, foi criado pela *New York Heart Association* (NYHA) um sistema que avalia o grau de comprometimento funcional conferido pela IC. Este sistema relaciona os sintomas com as actividades diárias e qualidade de vida do paciente proporcionando um meio simples de classificar a extensão da IC, atribuindo uma de quatro classes: a Classe I ou dispneia para grandes esforços; Classe II ou dispneia para esforços moderados; Classe III ou dispneia para pequenos esforços e Classe IV ou dispneia em repouso, apresentada na tabela 1.2.

Além do exame clínico, vários parâmetros contribuem para o diagnóstico desta patologia, inclusivamente estudos epidemiológicos, como os Critérios de *Framingham*, que são critérios úteis que enfatizam a natureza clínica.

Actualmente, um diagnóstico de IC usa como meio complementar, a realização de um ecocardiograma bidimensional, pois fornece informação muito importante para avaliação das alterações estruturais e da função cardíaca. Permite avaliar as dimensões e geometria das cavidades, as funções sistólica e diastólica, alterações estruturais e funcionais valvulares.

Tabela 1.2 – Classificação de NYHA.(traduzida e adaptada de Heart Failure Society of America: www.abouthf.org)

Classes	Sintomas dos Pacientes
Classe I	Sem limitação de actividade física. Actividade física comum não causa fadiga indevida, palpitação ou dispneia.
Classe II	Limitação ligeira da actividade física. Confortável em repouso, mas em actividade física de rotina resulta em fadiga, dispneia, ou palpitações.
Classe III	Marcada limitação de actividade física. Confortável em repouso, mas menos que os pacientes de Classe II. A actividade comum provoca fadiga, palpitação ou dispnéia.
Classe IV	Incapaz de realizar qualquer actividade física sem desconforto. Sente os sintomas de insuficiência cardíaca em repouso. Se qualquer actividade física é realizada, o desconforto é aumentado.

Outra das ferramentas fundamentais para o diagnóstico e prognóstico da doença é o recurso aos biomarcadores, como por exemplo às troponinas cardíacas específicas I e T, ao péptido natriurético do tipo B (BNP, do inglês *B-Type Natriuretic Peptide*) e à Proteína-C Reativa de alta sensibilidade (asPCR) que serão abordados com mais detalhe no subcapítulo 1.2.2.

1.2.1. Inflamação, sistema neuro-hormonal e função renal na Insuficiência Cardíaca

A inflamação é um processo biológico de resposta à lesão tecidular ou à exposição a agentes patogénicos, sendo um factor crítico na capacidade de auto-regeneração do organismo e/ou no seu combate à infecção. Embora a inflamação

possa ser benigna, a pesquisa nos últimos anos tem documentado o papel patogénico da inflamação na IC, e em particular a importância das citocinas, que medeiam a resposta inflamatória (BRAUNWALD, 2008).

Neste contexto, determinados estudos têm proposto que a IC desencadeia respostas ao *stress* das células da imunidade inata, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, e que a expressão dessas citocinas está associada a efeitos deletérios, como a apoptose e a necrose dos cardiomiócitos, o que acelera a progressão da IC (OIKONOMOU, 2011).

O sistema nervoso simpático é um componente crítico da resposta neuro-humoral na IC. Neste caso, o aumento da actividade simpática é seguido pelo aumento de neuro-hormonas no plasma (renina, norepinefrina, aldosterona, endotelinas e BNP), de forma a tentar compensar a progressiva perda da função cardíaca. Esse aumento melhora a hipertrofia miocárdica patológica, a afliência de oxigénio e a apoptose/necrose dos cardiomiócitos (SPINA, 2009).

A teoria hemodinâmica que ficou conhecida nos anos 60 e 70 do século passado, explica que na maioria dos casos de IC, há uma hipertrofia inicial dos miócitos, que reduz o *stress* parietal através do aumento da espessura da parede, segundo a *Lei de Laplace*. Esta teoria atribuía à remodelação cardíaca um processo mecânico compensador, contudo, tem sido considerada inadequada face à evolução do conhecimento sobre a IC. Estudos recentes referem que a remodelação cardíaca não só está associada a processos mecânicos, mas também surge aquando complexas alterações como a apoptose celular, alteração de expressão de genes, dissolução da estrutura de colágeno que mantém os miócitos unidos, crescimento da matriz extracelular, bem como a activação dos sistema RAA e neuro-hormonal. Para além das interacções existentes entre a patologia IC, o sistema neuro-hormonal e as respostas inflamatórias do hospedeiro, estão implícitas as lesões estruturais e funcionais de vários órgãos, principalmente do rim. Cerca de 50% dos pacientes com IC crónica e com função renal normal na avaliação inicial, desenvolvem disfunção renal (Rui GRADIZ, *in* Fisiopatologia Fundamentos e Aplicações, 2007). Nesta matéria, várias investigações têm mostrado uma correlação negativa entre o aumento da pressão venosa central e a taxa de filtração glomerular estimada (eGFR) em pacientes com IC. Estas afirmações foram confirmadas por um estudo de *Tanaka et al.*, o qual defende que a congestão venosa contribui para a deterioração da função renal na IC por aumento do *stress* oxidativo e a inflamação mediada por macrófagos

no túbulo-intersticial. É também reconhecido que o tratamento para a IC por vezes corresponde a um agravamento da disfunção renal (TANAKA, 2011).

De acordo com *Braunwald*, os preditores mais poderosos de mortalidade e hospitalização por IC, depois do BNP, são a norepinefrina, a actividade da renina plasmática e a aldosterona. Conhecidas as interacções existentes entre a inflamação, o sistema neuro-hormonal e a IC é possível iniciar estudos para terapias direccionadas e utilizar os péptidos supracitados como biomarcadores fundamentais no diagnóstico da IC.

1.2.2. Biomarcadores na Insuficiência Cardíaca

Em geral, os biomarcadores são considerados como o passo além do exame clínico, electrocardiograma (ECG), raios-X e ecocardiograma, para a classificação de pacientes com suspeita de IC. Os biomarcadores podem fornecer informações para a avaliação da gravidade da doença, estimativa do prognóstico e para a selecção de tratamento (GRUSON, 2011).

Por definição, os biomarcadores são parâmetros biológicos mensuráveis e quantificáveis (por exemplo, a concentração de uma enzima e/ou hormonas específicas) que servem como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas farmacológicas. Um biomarcador cardíaco pode ser quantificado numa amostra biológica (sangue, urina ou tecido de biópsia), numa gravação (pressão arterial, *Holter*), ou pode ser um exame imagiológico (electrocardiograma, *computerized tomography* (CT scan)). (CLERICO, 2009).

De acordo com a sua utilidade, de uma maneira geral os biomarcadores podem ser classificados em cinco categorias: i) biomarcadores precoces (identificam o risco de desenvolver uma doença); ii) biomarcadores de triagem (*screening* para doença subclínica); iii) biomarcadores de diagnóstico (reconhecem a doença manifesta); iv) biomarcadores de teste (categorizam a gravidade da doença); v) biomarcadores de prognóstico (previsão da evolução da doença no futuro, incluindo recorrência e resposta à terapêutica e monitorização da eficácia do tratamento) (BRAUNWALD, 2008).

As propriedades desejáveis de um biomarcador podem variar de acordo com a sua utilização. Assim, para biomarcadores de triagem, são características importantes

a alta sensibilidade, especificidade e valores preditivos. No caso dos marcadores de diagnóstico de doenças cardíacas, além das características acima mencionadas, o aumento rápido e sustentado, a alta especificidade ao tecido, a libertação proporcional à extensão da doença, são pontos importantes a considerar (CLERICO, 2009).

Independentemente da finalidade do seu uso, um biomarcador ideal deve ter valor clínico somente se for de uma grande precisão, as medições devem estar disponíveis para o clínico a um custo razoável e com tempos de resposta curtos. O biomarcador deve fornecer informações que não estão disponíveis a partir de uma avaliação clínica criteriosa, sendo que o conhecimento da sua quantificação deve auxiliar na tomada de decisão médica (MYERS, 2009).

Os biomarcadores cardíacos podem ser divididos funcionalmente em seis categorias, bem como uma sétima categoria de novos biomarcadores que ainda não foi completamente caracterizada.

As categorias são (BRAUNWALD, 2008):

- a) Inflamação: proteína C-reativa de alta sensibilidade (asPCR); factor de necrose tumoral α (TNF- α); e as interleucinas 1, 6 e 18;
- b) *Stress* oxidativo: oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, mieloperoxidase, isoprostanos urinário e plasmasmático;
- c) Remodelação da matriz extracelular: metaloproteinases da matriz, inibidores tecidulares de metaloproteinases e propéptidos de colagénio;
- d) Neuro-hormonas: noradrenalina, renina, angiotensina II, aldosterona, arginina vasopressina e endotelina;
- e) Lesão dos miócitos: troponinas cardíacas específicas I e T, miosina quinase de cadeia leve-I, ácidos gordos e fração MB da creatina quinase;
- f) *Stress* dos cardiomiócitos: BNP e pro-BNP;
- g) Novos biomarcadores: CgA, galectina 3, osteoprotegerina, adiponectina e factor de crescimento de diferenciação 15.

Dos biomarcadores descritos na literatura, relativamente poucos satisfazem a maior parte dos critérios de marcador ideal. No entanto, fornecem informações importantes sobre a patogénese da IC e/ou a identificação de indivíduos em risco de IC. Actualmente, os clínicos consideram que o uso de uma estratégia de múltiplos biomarcadores (*MultiMarker*) baseada na integração de biomarcadores de diferentes

categorias, como um de inflamação (asPCR), um de estiramento excessivo do tecido cardíaco (BNP) e ainda um de avaliação da necrose celular (troponinas) é o mais conveniente e abrangente. (GRUSON, 2011).

1.2.2.1. Proteína C-Reactiva de alta sensibilidade (asPCR)

Como mencionado anteriormente no subcapítulo 1.2.1, a inflamação desempenha um papel importante na progressão da IC, estimulando a remodelação cardíaca e a fibrose. Desta forma, os biomarcadores relacionados com a resposta inflamatória têm sido investigados pela sua capacidade de contribuir para a estratificação de risco de doentes com IC. Estudos recentes indicam que os níveis de proteína C-reactiva (PCR) aumentam devido a esta patologia (GRUSON, 2011). É uma proteína de fase aguda amplamente conhecida que é produzida pelo fígado em resposta à estimulação por citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- α nos processos inflamatórios e infecciosos. Em indivíduos saudáveis a sua concentração plasmática é muito baixa, no entanto na presença de infecções ou em resposta a estímulos inflamatórios pode ter um incremento até 1000 vezes. Em condições inflamatórias agudas, há aumento significativo nas 6 a 8 horas iniciais, podendo atingir valores de até 30 mg/L em 48 horas (GRUSON, 2011).

Recentemente demonstrou-se que mesmo um discreto aumento da PCR é um factor de risco cardiovascular independente de outros já conhecidos, como os níveis de colesterol total e fracções e homocisteína, além da idade, tabagismo, tensão arterial, diabetes, entre outras. O acompanhamento da concentração de PCR também na faixa de valores mais baixos pode ser útil na prevenção de doenças e acompanhamento do tratamento (BRAUNWALD, 2008).

Os métodos clássicos apresentam como limite de detecção da PCR o valor de 5 mg/L. Nos últimos anos foi desenvolvido um método ultra sensível para a deteção desta proteína com níveis de sensibilidade de 0,02 mg/L (asPCR), sendo a nefelometria o método mais sensível para detectar pequenas alterações nestes níveis tão baixos. A sua facilidade de doseamento e a disponibilidade do método fazem dela um atraente biomarcador para a avaliação do estado inflamatório em doentes com doença cardíaca (OIKONOMOU, 2011).

Os valores típicos de PCR para os indivíduos saudáveis estão indicados na bibliografia como inferiores a 3 mg/L. Já níveis elevados estão associados a maior risco cardiovascular, o que confirma evidências recentes de que, pelo menos parcialmente, a aterosclerose é uma doença inflamatória.

A determinação da PCR de alta-sensibilidade é o teste actualmente mais usado como marcador de inflamação para o diagnóstico de IC e é útil para a identificação de indivíduos assintomáticos com risco de doença cardiovascular por aterosclerose e para o acompanhamento de pacientes que já a tenham, como indicador de agravamento clínico. A PCR tem também bom valor preditivo na determinação de risco de eventos vasculares futuros em pacientes com síndrome coronário agudo, tais como enfarte do miocárdio, em indivíduos com angina estável e acompanhamento de pacientes hipertensos com diabetes (YIN, 2004).

A asPCR tem um efeito aditivo quando combinada com o colesterol total e a relação colesterol total/HDL-colesterol, aumentando consideravelmente o valor preditivo desses testes (DENARDI, 2008).

Os níveis séricos de asPCR são bastante estáveis, excepto durante ou logo após o episódio de inflamação, de natureza infecciosa ou não. Assim, o seu doseamento com finalidade de avaliar o risco de doença aterosclerótica só deverá ser feito de duas a três semanas após o término do episódio inflamatório.

Mesmo os indivíduos que têm resultados de asPCR no limite superior do intervalo de referência, têm 1,5 a 4 vezes o risco aumentado de ter um ataque cardíaco.

A *American Heart Association* (www.heart.org) definiu os seguintes grupos de risco:

- Risco baixo: inferior a 1,0 mg / L
- Risco médio: 1,0 a 3,0 mg / L
- Alto risco: acima de 3,0 mg / L

Estes valores são uma parte do processo total de avaliação de risco para as doenças cardiovasculares. Grandes estudos prospectivos demonstram que níveis elevados de PCR em idosos prevêm o desenvolvimento de IC. Além disso, a PCR tem mostrado exercer efeitos nocivos directos sobre o endotélio vascular, reduzindo a libertação de óxido nítrico, aumentando a produção de endotelina-1 e induzindo a expressão de moléculas de adesão endotelial (BRAUNWALD, 2008 & von HAFE,

2011). Estas descobertas sugerem que a PCR pode desempenhar um papel causal na doença vascular, podendo portanto ser um alvo da terapia. No entanto, níveis elevados de PCR carecem de alguma especificidade, são associados com diferentes patologias como infecções agudas e crónicas, síndrome coronário agudo e estados inflamatórios activos inespecíficos. Assim, o diagnóstico deve ser baseado na clínica, tendo em conta uma combinação de história, exame físico, assim como, a utilização de outros biomarcadores (BRAUNWALD, 2008).

1.2.2.2. Péptido natriurético do tipo B (BNP)

O BNP é um biomarcador utilizado na IC e que avalia o *stress* dos miócitos. É segregado no miocárdio ventricular durante os períodos de estiramento, aumentando a tensão na parede cardíaca. O BNP é um dos elementos do sistema peptídico natriurético que é composto por três moléculas - o tipo A (ANP), libertado pelas aurículas, o tipo B (BNP), libertado pelos ventrículos e o tipo C (CNP), libertado pelas células endoteliais. O BNP por ser libertado diretamente pelos ventrículos é o teste que apresenta melhor eficiência no diagnóstico de IC. Assim, como o ANP, o BNP promove diurese, vasodilatação periférica, inibição do sistema renina angiotensina e inibição da actividade simpática, estabelecendo um papel importante na regulação da pressão arterial, volume sanguíneo e equilíbrio de sódio. (VILLACORTA, 2002).

A prohormona de cada péptido natriurético é codificada por um gene separado. Uma vez segregado, o precursor do BNP que contém 108 aminoácidos é clivado por uma protease e daí resulta um fragmento inactivo de 76 aminoácidos aminoterminal (não funcional), um de 32 aminoácidos carboxi-terminal biologicamente activo (BNP) e num fragmento N-terminal (NT-proBNP) inactivo e que devido às suas propriedades natriuréticas, diuréticas e vasodilatadoras, reduz a sobrecarga de volume e hipertensão no doente (figura 1.3) (PALAZZUOLI, 2010).

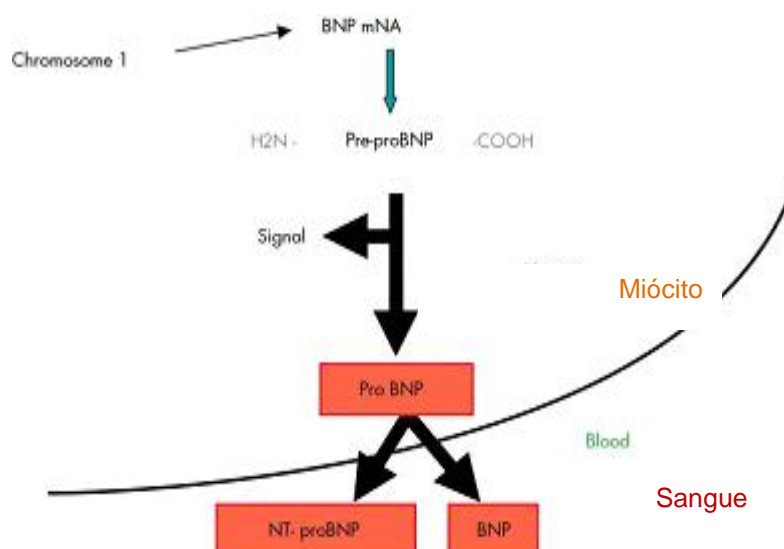


Figura 1.3- Síntese e secreção do BNP.(figura retirada de *Betencourt*, 2005).

Fisiologicamente, a função mais provável do BNP é neutralizar os estímulos para a hipertrofia e remodelação do coração. Embora o BNP seja armazenado com o ANP em grânulos nas aurículas, não é armazenado nos grânulos nos ventrículos. Pelo contrário, a produção de BNP ventricular possui a sua transcrição regulada pela distensão da parede cardíaca auricular, que resulta da sobrecarga de volume, e sugere uma importante regulação parácrina da massa ventricular. Em condições patológicas, como na IC, a síntese do BNP nos miócitos aumenta consideravelmente, levando a níveis no plasma que são similares ou mesmo superiores aos do ANP. Por isso, níveis altos de BNP no plasma podem servir como um importante marcador bioquímico para detectar hipertrofia ventricular e cardíaca (BETENCOURT, 2005).

O BNP é considerado um importante biomarcador cardíaco por possuir várias características: i) o conhecimento dos seus valores garante uma melhor precisão de diagnóstico, em comparação com a ecocardiografia na fase inicial de doenças cardíacas. ii) os valores iniciais de BNP oferecem informação prognóstica significativa. iii) a concentração circulante de BNP e/ou NT-proBNP está fortemente relacionada com o *stress* da parede ventricular esquerda, proporcionando assim a possibilidade de avaliação da gravidade da IC, independentemente de outros estudos demonstrarem que o padrão de liberação de troponina I (TropI) após a

administração de drogas cardiotoxícas está directamente relacionado com a remodelação ventricular e disfunção miocárdica. Quando usados em simultâneo, a Tropl e o BNP têm-se mostrado excelentes biomarcadores de diagnóstico e prognóstico nas síndromes coronárias agudas por possuírem diferentes mecanismos fisiopatológicos, fornecendo diferentes mas complementares informações clínicas. (CLERICO, 2009 & CHEN, 2010). O BNP é considerado um biomarcador precoce e preciso de compromisso cardíaco, IC progressiva, e mortalidade em pacientes com doença sistémica inflamatória crónica (CLERICO, 2009). Alguns autores têm sugerido que o BNP poderia servir como parâmetro de avaliação terapêutica, e propõem o seu retorno aos níveis séricos basais como objectivo final do tratamento e não apenas a melhoria dos sintomas.

1.3. A Cromogranina A na Insuficiência Cardíaca

Nos anos 80, *O'Connor* e a sua equipa apresentaram os primeiros estudos sobre a presença da CgA em doentes com hipertensão, o que abriu o caminho para o reconhecimento da função cardiovascular desta proteína. Mais tarde, investigações bioquímicas, fisiofarmacológicas e clínicas, convergiram em apontar relevantes e inesperadas propriedades cardio-circulatórias da CgA (ANGELONE, 2012).

Embora o estímulo para produção de CgA e o papel fisiopatológico que esta desempenha na actividade cardiovascular, continuem por ser definidos com precisão, a explicação para a ligação entre a CgA e a propensão para desenvolver IC é devido à CgA ser uma prohormona com múltiplos sítios de clivagem proteolítica que gera péptidos derivados, com uma ampla gama de efeitos biológicos, tais como vasodilatação, indução de apoptose inibição da secreção de catecolaminas e acções lusitrópicas negativas. Estas últimas comprometem a capacidade de relaxamento do coração e podem dever-se à activação dos fibroblastos e células endoteliais contribuindo desta maneira para a remodelação cardíaca e disfunção diastólica (JANSSON, 2009). Várias evidências têm contribuído para o confirmar: a sua detecção morfológica no coração foi seguida pela demonstração de um sistema de processamento proteolítico intracardíaco. Também a coexistência de CgA com outras hormonas peptídicas e aminas simpaticomiméticas nas vesículas secretoras

sugere que os níveis sanguíneos de CgA poderão ser um marcador importante da actividade do sistema nervoso simpático (von HAFE, 2011).

A CgA e os seus péptidos derivados podem operar em dois níveis diferentes: a nível sistémico e a nível local. A nível sistémico actuando em conjunto com as catecolaminas, a angiotensina II, as citocinas entre outros, na resposta ao *stress*, e a nível local no coração, estimulando-o química e fisicamente levando a que a CgA gere péptidos cardioactivos, como por exemplo a vasostatina, a catestanina e a serpinina. Estes péptidos foram indicados como modeladores da contractibilidade e relaxamento do miocárdio podendo alterar o desempenho basal e a resposta à estimulação adrenérgica por parte do coração. (figura 1.5). Muito recentemente foi ainda acrescentada uma nova descoberta que refere as propriedades cardiotrópicas da própria CgA intacta bem como do seu fragmento C-terminal: a serpinina (ANGELONE, 2012).

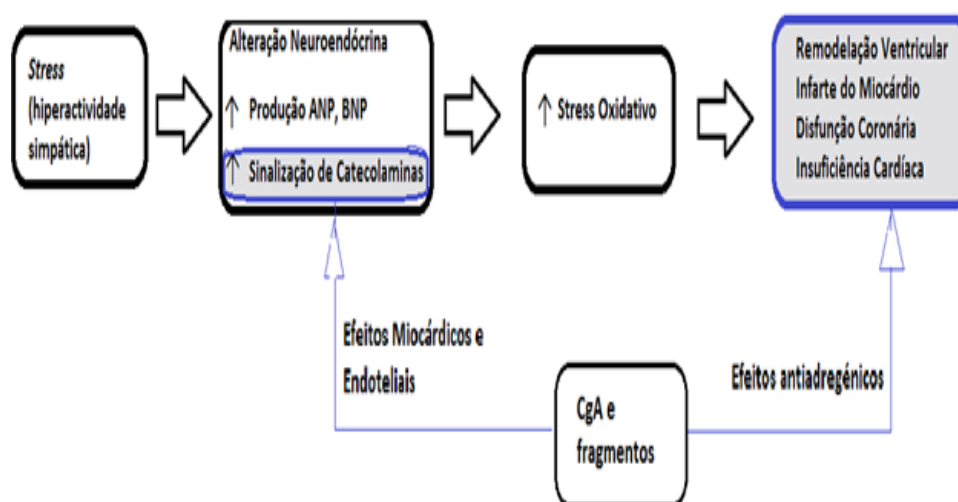


Figura 1.4 - Representação esquemática de alguns eventos que caracterizam a Insuficiência Cardíaca, indicando os locais possíveis para a intervenção da CgA e seus péptidos derivados (Traduzido e adaptado de Angelone, 2012).

Em contraste com os dados crescentes sobre os efeitos cardíacos dos fragmentos derivados da CgA, desconhece-se com exactidão em que medida, também a CgA intacta é capaz de influenciar o coração. Para preencher essa lacuna, Angelone *et al* estudaram os efeitos cardíacos no coração de ratos, que foram

isolados e perfundidos com CgA intacta. Constataram que a exposição a concentrações nanomolares de CgA intacta semelhantes ao encontrado no plasma humano, em condições normais, induzia efeitos inotrópicos negativos e lusitrópicos. Adicionalmente, observou-se que CgA administrada provoca uma significativa dilatação coronária. Estes factos levaram estes cientistas a pensar que os efeitos da CgA intacta no coração, dependem de um complexo mecanismo endotelial, o qual pode ser de particular importância, uma vez que a grande dimensão da proteína pode impedir que esta alcance o miocárdio. Estes estudos estão em curso, sendo o objectivo provar que existe uma natural defesa do coração contra hiperactividade cardíaca exagerada ("Tempestade neuroendócrina", cardiomiopatia neuroendócrina, necrose miocárdica) tendo em conta os mecanismos de contra-regulação cardíacos provocados pela CgA (ANGELONE, 2012).

Foi recentemente demonstrada a produção de CgA pelo miocárdio em seres humanos com cardiomiopatia dilatada e hipertrófica, sugerindo que os níveis de CgA podem ser libertados a partir do miocárdio, em condições caracterizadas por pressão ou volume de sobrecarga. No entanto, isto não exclui a possibilidade de outros órgãos, incluindo as supra-renais, poderem contribuir para o aumento plasmático de CgA (JANSSON, 2009). Outros estudos têm demonstrado que essa produção aumenta em proporção com a gravidade clínica e está associada com o prognóstico de IC crónica (ICC) e pós-enfarte (RØSJØ, 2010).

A constatação de que nos miócitos atriais a CgA é co-armazenada com o ANP enquanto nos miócitos ventriculares é co-localizada com o BNP, sugere uma correlação com péptidos natriuréticos, o maior sistema hormonal do coração (PIERONI, 2007).

Existem divergências na literatura, relativamente á utilidade da CgA como marcador de prognóstico independente para a IC. Segundo vários estudos, particularmente um de Ceconi *et al*, os níveis plasmáticos da CgA aumentam em proporção com a severidade clínica de IC e são um indicador de prognóstico independente para a mortalidade em doentes com ICC. Nesse estudo o poder preditivo da CgA em doentes agrupados por classes de NYHA (II a IV) foi mantido em todas as classes e a probabilidade de sobrevivência de pacientes com CgA acima da média foi três vezes menor que os pacientes que apresentavam níveis de CgA abaixo da média. (CERCONI *et al*, 2002).

Ao contrário dos estudos anteriores em que os resultados eram bastante animadores, foi efectuado um outro estudo que envolveu 1233 participantes com evidência clínica de IC (NYHA II-IV), onde se verificou que pacientes com níveis elevados de CgA também apresentavam níveis elevados de BNP e asPCR. Os níveis plasmáticos elevados de CgA estavam fortemente associados com a taxa de mortalidade observada, sendo que no total da população observada, a idade, os níveis de creatinina e os sintomas de IC (NYHA) foram os maiores factores preditivos de mortalidade. Este grupo de investigação verificou curiosamente que os níveis de CgA poderiam ser discriminativos da situação de pacientes que apresentavam um prognóstico mais favorável podendo ser um indicativo da progressão da doença, mas o poder de prognóstico foi inferior quando comparado com outros biomarcadores nomeadamente o BNP, contudo superior à asPCR (RØSJØ, 2010).

A CgA pode ser um bom biomarcador em situações de emergência e em patologias como a síndrome coronária aguda, enfarte do miocárdio e IC aguda, mas em situações de IC em que a patologia está controlada não aumenta o valor de previsão, diagnóstico e prognóstico de outros biomarcadores como por exemplo o BNP. (RØSJØ, 2010). Será preciso mais investigação para avaliar se a CgA como biomarcador cardiovascular pode ser utilizado em alternativa e/ou em adição a biomarcadores convencionais, com uma avaliação de risco melhorada.

No entanto vários recursos práticos podem contribuir para o seu uso futuro. Antes de um novo biomarcador ser incluído na clínica cardiovascular, é obrigatória a sua validação, por meio de um longo e controlado processo feito de várias etapas. O primeiro passo é uma triagem inicial, em busca de uma correlação entre a proteína e a patologia sob investigação. Subsequentes ensaios clínicos permitem cruzar e correlacionar o prognóstico, diagnóstico ou monitorizar propriedades da proteína com outros marcadores. Seguidamente, há que mover a proteína para a aplicação clínica e submetê-la a análises em grande escala, a fim de verificar em que medida, contribui para o risco de estratificação. Se todas as indicações provenientes do processo de validação são positivas, antes de ser incluída na rotina clínica, tem que satisfazer requisitos adicionais, tais como a disponibilidade de um método padronizado aceitável para a sua avaliação bioquímica e, preferivelmente, de baixo custo. Todos estes processos exigem que o equilíbrio biológico da proteína seja bem conhecido, tais como a sua taxa de síntese e degradação, a sua correlação com o ritmo cardíaco, a interferência com várias drogas, planos terapêuticos, entre outros. No

caso da CgA, a sua longa meia-vida *in vivo* de aproximadamente 18 minutos e as suas concentrações circulantes relativamente elevadas em condições normais, independentemente da idade e do sexo, reduzem a possibilidade de medições falsas, facilitam tanto a colheita de sangue como a fase pré-analítica e ainda a determinação final (STEINER, 1990; ANGELONE, 2012).

1.4. Análise da Cromogranina A por Métodos Imunoquímicos

Todos os métodos imunoquímicos têm por base uma ligação específica entre um antígeno e um anticorpo, ou ocasionalmente, sobre as interações não específicas de anticorpos livres ou ligados com certos compostos (receptores do complemento, proteína A) ou receptores da célula (Fc-receptores).

Os métodos imunoquímicos são usados para demonstrar a presença de um antígeno ou para determinar a sua quantidade (quando um anticorpo específico está disponível), ou a quantidade de um anticorpo (quando um antígeno específico está disponível). O curso da reacção antígeno-anticorpo é medido por um decréscimo do componente do par de reacção ou, com maior frequência, pela formação de um produto de reacção, o complexo antígeno-anticorpo.

Na formação do complexo antígeno-anticorpo, há alguns factores básicos que devem ser considerados: o tipo de antígeno e do anticorpo, o ambiente no qual a reacção tem lugar e o método de identificação de complexos.

O complexo imune produzido pode ser detectado a olho nu (precipitado ou aglutinação), após coloração com corantes histoquímicos (geralmente reagindo com proteínas), por diferentes métodos ópticos (turbidimetria, nefelometria, espectrofotometria) ou após um dos componentes (antígeno ou anticorpo) reagir com um isótopo radioactivo ou com outro composto com a função de marcador. O antígeno ou anticorpo deve ser marcado antes da interacção mútua. Vários isótopos radioactivos como ^{14}C , ^3H , ^{125}I e ^{75}Se (radioimunoensaio-RIA) e enzimas (enzima-imunoensaio – EIA), podem ser usados como marcadores (DELVES, 2011)

Alguns dos métodos mais usados em Imunoquímica são o radioimunoensaio, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), ensaio imunoradiométrico (IRMA); o *Western blot*, a imunoprecipitação, a seroaglutinação, a imunoelectroforese

e a imunofluorescência. Contudo, para a elaboração deste trabalho as técnicas utilizadas para a análise da CgA são a RIA, a IRMA e a ELISA.

1.4.1. Radioimunoensaio (RIA)

O Radioimunoensaio é uma técnica *in vitro* muito sensível que permite quantificar pequenas quantidades de substâncias (antígenos) no sangue, através da utilização de anticorpos. Este método foi desenvolvido em 1959 por dois americanos, o biofísico *Rosalyn Yalon* e o médico *Solomon A. Berson*, com a criação da primeira técnica de radioisótopos para o estudo do metabolismo da insulina, tendo sido a primeira vez que os níveis de uma hormona no sangue foram detectados na ordem dos nano e pico molar. Em 1977, *Rosalyn Yalon* foi condecorada com o Prémio Nobel da Medicina pelo desenvolvimento do RIA para a insulina e esta descoberta revolucionou várias áreas da investigação e da prática clínica, nomeadamente na endocrinologia, quantificação de fármacos, entre outras. Os autores desta técnica recusaram patentear o ensaio, pois defendiam que deveria estar disponível e ser de fácil acesso para o bem da medicina (GLICK, 2011).

Genericamente, esta técnica visa determinar a concentração de antígenos com uma elevada precisão pela marcação radioactiva do antígeno alvo e apresenta uma ampla aplicação na determinação da concentração de hormonas.

Para a realização da técnica de RIA é necessário que uma quantidade conhecida do antígeno em estudo se torne radioactivo, sendo esta transformação frequentemente realizada com o auxílio de isótopos de iodo ligados á tirosina, que emitem radiação gama. Devido à facilidade com que os átomos de iodo podem ser introduzidos em resíduos de tirosina de uma proteína, os isótopos radioactivos I^{125} ou I^{131} são frequentemente utilizados. Este antígeno marcado radioactivamente é misturado com uma quantidade conhecida de anticorpo, e como resultado existe uma ligação antígeno-anticorpo. Posteriormente, é adicionada uma quantidade da amostra a estudar que contém uma quantidade desconhecida do mesmo antígeno. Nesta solução irá existir uma competição pelos lugares de ligação do anticorpo, entre o antígeno marcado radioactivamente e o antígeno não marcado. À medida que aumenta a concentração de antígeno não marcado, mais amplifica a afinidade ao anticorpo, diminuindo a ligação com o antígeno marcado. O antígeno marcado

radioactivamente deixa de se ligar ao anticorpo e fica livre no sobrenadante que é posteriormente rejeitado.

A partir dos dados obtidos com um medidor de radiação gama e a utilização de amostras padrão, é possível elaborar uma curva de calibração e determinar a concentração de antigénio não marcado que está presente no soro do paciente. Após a determinação da proporção de antigénio ligado e/ou antigénio livre em cada amostra desconhecida, as concentrações de antigénio podem ser lidas directamente a partir da curva padrão.

Desta forma, é possível determinar qualquer tipo de molécula biológica, desde que tenha como pré-requisitos um receptor específico ou que a molécula seja passível de ser marcada. A preparação do radioimunoensaio acarreta três principais pontos: i) substância isolada e purificada; ii) anticorpos específicos para a substância iii) substância marcada radioactivamente.

- i) A substância é isolada e purificada através de técnicas de separação cromatográficas, por exemplo, com gel de poliacrilamida;
- ii) Anticorpos específicos, por exemplo, por injeção de material proteico em animais de diferente espécie do qual foi colhido o antigénio, induzem a produção de anticorpos específicos para a utilização em análises imunológicas;
- iii) Substância marcada por isótopos radioactivos, maioritariamente marcados com ^{125}I , por iodação após oxidação do Na^+I^- , onde o I reactivo se liga livremente ao grupo tirosina das moléculas proteicas (OLIVEIRA, 2002).

Desde o aparecimento do primeiro radioimunoensaio de *Berson e Yalon* esta técnica tem sido apresentada com algumas variantes, sendo que a mais utilizada actualmente é a técnica de fase sólida. Um anticorpo secundário é conjugado com glutaraldeído nas paredes dos tubos de ensaio de polipropileno e após a reacção convencional dos radioimunoensaios realizada dentro desses tubos, o complexo antigénio-anticorpo liga-se aos locais do anticorpo secundário fixados na fase sólida (paredes do tubo) enquanto o antigénio livre permanece na fase líquida. Para separar estas duas fracções, descarta-se a fracção líquida obtendo-se nas paredes do tubo a fracção antigénio-anticorpo secundário. É o método mais utilizado actualmente (ROITT'S, 2011).

1.4.1.1. RIA na quantificação da Cromogranina A

A primeira técnica de RIA para quantificar a CgA foi descrita em 1986 (O'CONNOR & DEFTOS, 1986). A partir dessa data, tem sido utilizada em vários trabalhos para o estudo da quantificação da CgA intacta humana. Em 2000 Stridsberg, publicou um estudo onde referenciava a quantificação de regiões definidas da CgA. Actualmente, o método mais utilizado para dosear esta glicoproteína é um método competitivo com base em anticorpos policlonais de coelho que utiliza a técnica do duplo anticorpo de fase sólida. Os anticorpos são produzidos contra um fragmento purificado contendo aminoácidos de uma sequência pré-definida da molécula de CgA e tem sido empregue para quantificar tanto a CgA intacta como alguns dos seus fragmentos. Este antissoro de coelho é muito específico e impede que ocorram reacções cruzadas, por exemplo para com a substância P, o glucagon, a amilina, a somatostatina, peptídeo relacionado com o gene da calcitonina e pancreastatina 25-51 (STRIDSBURG, 1993 e 1995).

Devido à facilidade com que os átomos de iodo podem ser introduzidos em resíduos de tirosina da CgA, o isótopo radioativo I^{125} é o mais utilizado.

Será aqui dado um exemplo concreto da aplicação desta técnica, com recurso a um *Kit* comercial (IBLRIA).

Princípio do método:

O antígeno CgA em padrões e amostras compete com antígenos CgA radioactivos (I^{125} -CgA) pela ligação aos anticorpos específicos (antisoro de coelho para a CgA humana, aminoácidos 116-439). O antígeno I^{125} -CgA liga-se aos anticorpos numa proporção inversa à concentração de antígeno de CgA presente na amostra. Os anticorpos ligados à I^{125} -CgA são separados das fracções não ligadas através da adição de um anticorpo secundário de fase sólida que é neste caso um anti-soro IgG anti-coelho acoplado a partículas de celulose.

Posteriormente e após centrifugação, decanta-se o sobrenadante e contabiliza-se a radioactividade do *pellet* num contador gama.

A execução do teste engloba a prévia preparação de 7 padrões com diferentes concentrações estipuladas, respeitando as diluições, homogeneizações, pipetagens e

incubações necessárias ao longo do processo. As amostras a serem analisadas (desconhecidas) devem ser executadas em paralelo com padrões e controles. A concentração da CgA das amostras é obtida por interpolação na curva de calibração, que se designa pela representação gráfica da fracção ligada contra as concentrações da CgA padrão.

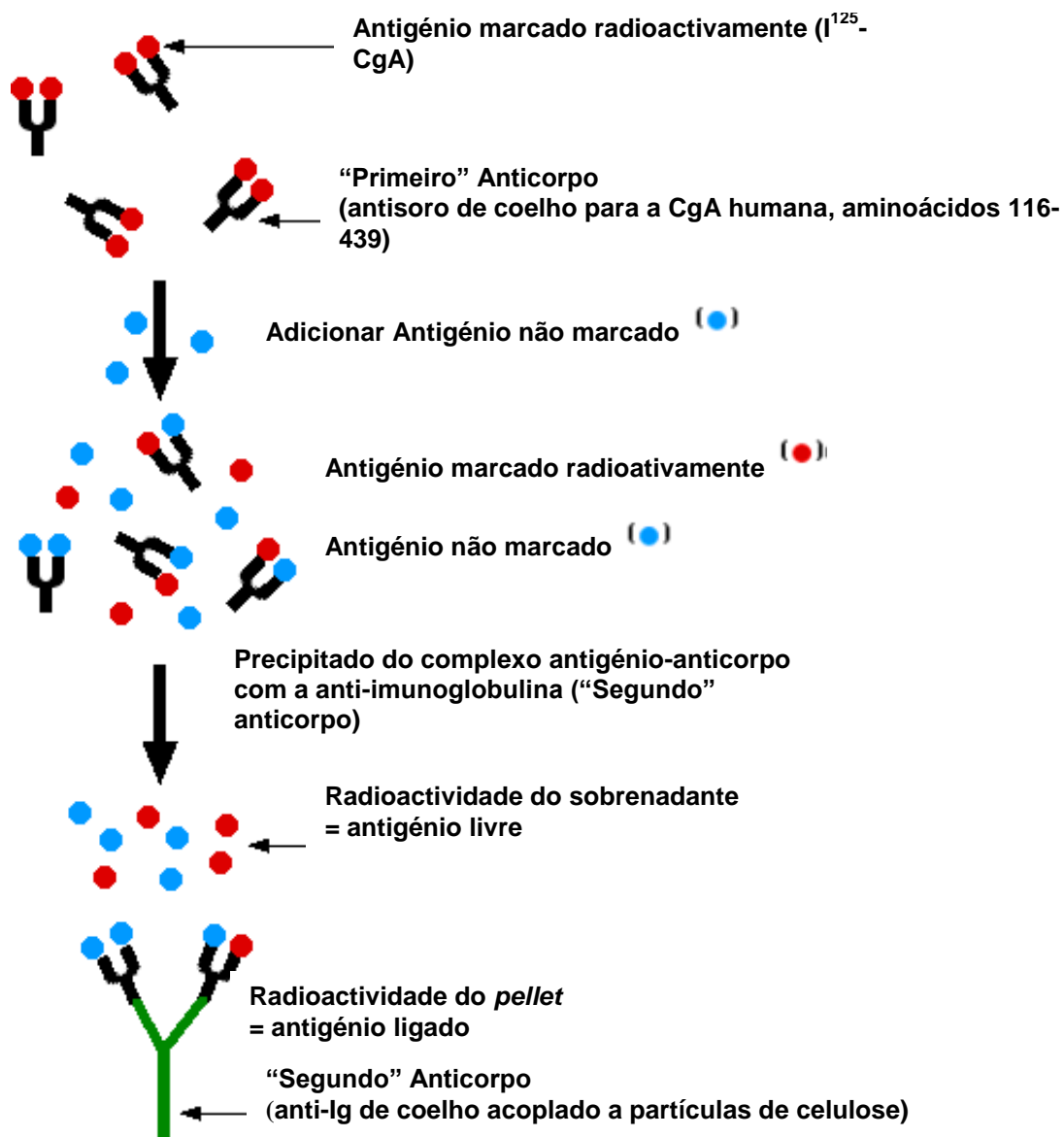


Figura 1.5 - Esquema da técnica de Radioimunoensaio (RIA), com recurso ao anticorpo secundário (Traduzido e adaptado de <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/Radioimmunoassay.html>)

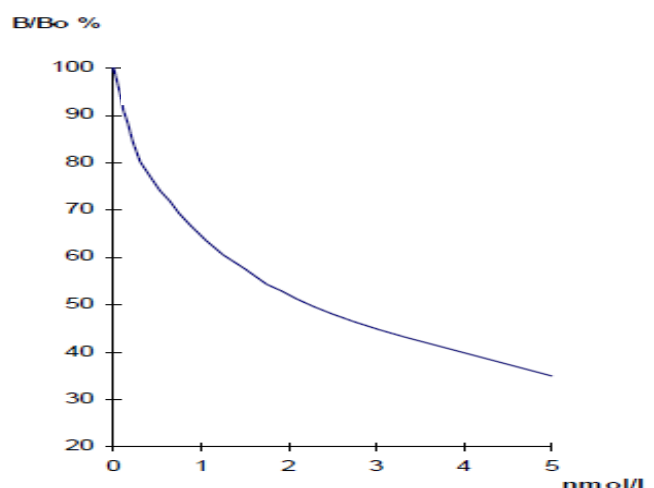


Figura 1.6 - Esquema de uma curva padrão de RIA para detecção de CgA. (bula do *kit* IBLRIA)

Para obter esta curva, subtrai-se a média da taxa de contagem (CPM) dos tubos correspondentes ao branco (NSB) à taxa de contagem (CPM) de padrões, controlos e amostras. A curva padrão é gerada através da representação gráfica da fracção ligada, CPM ou B/TOT , contra as concentrações da proteína (por exemplo, a CgA) dos padrões.

Esta técnica tem uma grande sensibilidade pois utiliza anticorpos de elevada afinidade ($K_D = 10^8$ - 10^{11} M⁻¹), sendo possível detectar poucos picogramas (10-12 pg) de antigénio.

Os valores de referência para níveis normais de CgA devem ser definidos por cada laboratório, no entanto cada *kit* comercial sugere um intervalo baseado nos resultados do doseamento de uma população definida. As unidades utilizadas por cada *kit* são também variáveis.

1.4.2 . Ensaio Imunoradiométrico (IRMA)

Alternativamente ao RIA, poder-se-á usar o ensaio imunoradiométrico que utiliza anticorpos marcados sem requerer o antigénio na forma pura, pois este não precisa de ser marcado. Os anticorpos apresentam uma maior estabilidade e são facilmente marcados sem comprometer a sua função.

Na sua versão mais actual e mais utilizada, o princípio deste teste baseia-se na imobilização de anticorpos nas paredes de tubos de poliestireno. Durante a primeira fase de incubação o soro do paciente, padrões e controlos contendo CgA são incubados com anticorpos marcados radioactivamente, usualmente com I^{125} , dentro dos tubos revestidos. O antigénio da amostra liga-se aos anticorpos específicos imobilizados e aos anticorpos marcados com I^{125} resultando um complexo *sandwich* (anticorpo antiCgA-CgA-anticorpo radioactivo). Os anticorpos radioactivos não ligados são removidos por decantação e posterior lavagem. A intensidade da radiação é lida num contador de raios gama e é proporcional á concentração de antigénio da amostra. A concentração da CgA presente no soro do paciente, determina-se por extrapolação da curva de calibração previamente construída a partir de padrões com valores conhecidos. (fig. 1.7)

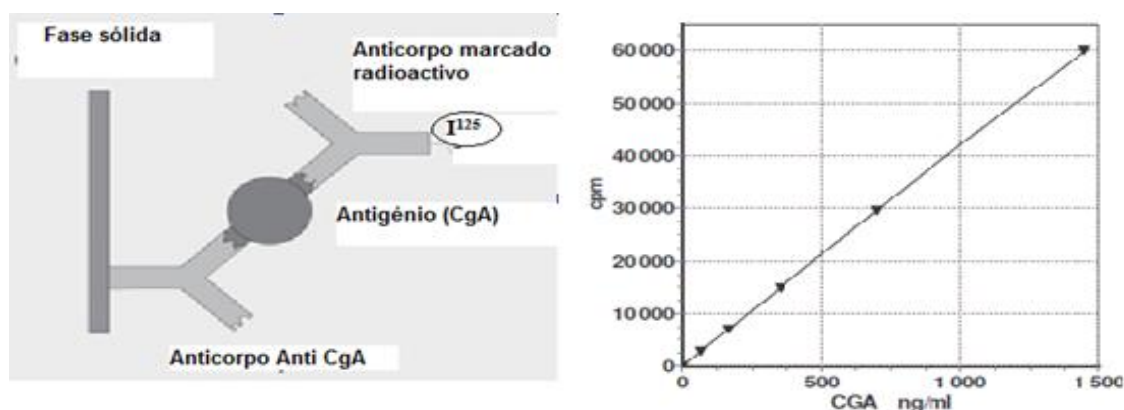


Fig 1.7 Esquemas de uma técnica IRMA e respectiva curva de calibração (traduzida e adaptada da bula do *kit* CGA-RIACT, Fardiotop)

O RIA ou o IRMA apresenta globalmente como vantagens o facto de ser um método altamente sensível, específico e de grande afinidade, baixo custo, requer pouca quantidade de amostra e rapidez. Como desvantagens podem-se apontar a instabilidade dos radioisótopos, o risco operacional, o elevado custo inerente à segurança e a dificuldade de descartar o material (WILD, 2005).

1.4.3. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA)

Os EIA podem ser classificados de acordo com o tipo de composto a ser determinado (antigénio ou anticorpo), com o componente que é marcado, pelo tipo de reacção (competitivo ou não competitivo) e pelo facto de o componente livre marcado estar separado do componente ao qual é associado. As primeiras publicações de EIA e ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) diferiam na concepção do ensaio, mas ambas as técnicas se baseavam no princípio do imunoensaio com recurso a uma enzima, substituindo a radioactividade como marcação, como foi mais usado até aos anos 70. A técnica de EIA foi primeiramente pensada por *Anton Schuurs*, investigador principal, do *Research Laboratories of NV Organon*, Oss, na Holanda e a técnica ELISA por *Eva Engvall* investigadora assistente na Universidade de Estocolmo, na Suécia. Durante uma reunião da ERIAC (*European RadioImmunoAssay Club*) em Basileia no início de 1970, a ideia de usar marcadores enzimáticos foi recebida com cepticismo e descrença, por levantar dúvidas de como poderia uma molécula tão volumosa e grande como uma enzima ser ligada a um antigénio ou anticorpo sem comprometer definitivamente a reacção imunoquímica entre antigénio e anticorpo.(CROWTHER,2005)

Contudo, *Engvall* e *Perlmann* publicaram o seu primeiro artigo com a técnica de ELISA em 1971 e nesse mesmo ano, *van Weemen* e *Schuurs* relataram que foi possível quantificar concentrações de gonadotrofina coriónica humanas na urina, descrevendo o método inovador de EIA. Estes investigadores utilizaram a enzima peroxidase de rábano acoplado, por meio de glutaraldeído, como marcação. Nesse período de transição, os sistemas de teste RIA eram essencialmente "caseiros", métodos desenvolvidos por investigadores independentes que não poderiam acompanhar o ritmo (principalmente financeiramente) de fabricantes comerciais alemães e americanos (ENGVALL,1971). Iniciou-se então a era da comercialização de *kits* EIA/ELISA onde técnicas de fase sólida foram utilizadas para o desenvolvimento de placas de microtitulação (96 poços) com um antigénio ou um anticorpo covalentemente ligado a um suporte de fase sólida. Desde então as técnicas de ELISA têm sido largamente usadas na investigação científica, tendo ultrapassado as 10 000 citações anuais desde meados de 1980 (LEQUIN, 2005).

Estes testes são também importantes porque se aplicam em contextos diferentes dos RIA.

Para qualquer tipo de EIA, deve escolher-se a enzima mais vantajosa e o procedimento mais adequado para a conjugação do antigénio com o anticorpo. Todos os locais imunoespecificamente reactivos, isto é, locais de ligação no anticorpo antigénicamente específico, devem ser preservados no conjugado resultante. Danos em locais imunoespecificamente reactivos reduzem a especificidade da reacção. Dependendo da actividade catalítica da enzima, a actividade enzimática do conjugado pode alterar-se ou manter-se constante.

De acordo com estes critérios, os métodos EIA podem ser divididos em dois grupos principais: métodos EIA homogéneos, onde a actividade catalítica da enzima no conjugado diminui ou aumenta e métodos EIA heterogéneos, nos quais a actividade catalítica da enzima no conjugado não altera.

Contrariamente ao EIA homogéneo, os métodos heterogéneos EIA exigem que o componente reactivo livre marcado seja separado do componente reactivo ligado marcado no complexo com o anticorpo. O objectivo deste método é a imobilização de um dos pares de reagentes pela ligação a um suporte sólido (normalmente a parede do tubo de ensaio ou o poço de uma microplaca). A separação dos componentes livres e conjugados, é facilmente conseguida através de lavagens.

As enzimas utilizadas nestas técnicas devem ter um peso molecular relativamente baixo, elevada estabilidade e actividade enzimática. Devem permitir a ligação covalente a anticorpos e a vários grupos funcionais de antigénios, o produto da reacção da enzima deve ser de cor facilmente detectável. Entre as enzimas que satisfazem estas condições, a peroxidase de rábano (PRR) e a fosfatase alcalina (FA) são as mais amplamente utilizadas.

Os ELISAs por definição exploram a utilização de uma enzima ligada a um dos reagentes utilizados no teste. A subsequente adição de substratos de enzimas relevantes/cromogénios provoca uma alteração de cor. Os resultados podem ser lidos e quantificados utilizando espectrofetómetros.

O facto de as proteínas (incluindo anticorpos) poderem ser passivamente anexadas a plásticos tem sido explorado na maioria das aplicações de ELISA. Uma vez que um dos componentes está ligado a uma fase sólida por adsorção passiva, os

reagentes subsequentes podem ser adicionados, e após um período de incubação, o material que não reagiu pode ser simplesmente lavado.

O desempenho das técnicas de ELISA e ensaios de fase sólida dependem de quatro grandes princípios:

- a) De uma variedade de enzimas, incluindo a PRR e a FA - os mais utilizados – que podem ser acoplados quimicamente a qualquer anticorpo ou antígeno, sob condição de manter as propriedades biológicas (isto é, interação do substrato e ligação ao antígeno);
- b) As maiorias dos antígenos como proteínas, peptídeos, polissacarídeos, ligam-se espontaneamente a superfícies de plástico como os poços de placas de poliestireno. Anticorpos, podem também anexar-se, mantendo a sua actividade de antígeno de ligação. Quando os antígenos ou anticorpos aplicados para revestir a fase sólida estiverem ligados, tornam-se resistentes à lavagem vigorosa com tampão, enquanto o excesso de reagente não ligado é simplesmente removida por este processo;
- c) Há ainda a considerar que em etapas subsequentes, uma ou mais camadas de uma fase sólida de imunocomplexos são formadas com entidades não ligadas de forma eficiente, são novamente lavados. Esta é a base para avaliar a especificidade de um sinal não específico quando as enzimas capturadas reagem com o substrato;
- d) Por fim, um anticorpo conjugado com enzima ou com antígeno, quando ligado no complexo imune, deixa o componente enzimático do substrato disponível para interação. A adição de substrato, na forma usual do ensaio, resulta numa solução de progressiva mudança de cor do substrato. A reacção pode ser parada numa fase apropriada e o sinal de cor determinado por medição da densidade ótica.

O processo mais amplamente utilizado na fase sólida, é de longe a placa de microtitulação de 96 poços fabricados a partir de cloreto de polivinilo (PVC, placas flexíveis) ou poliestireno (placas inflexíveis "rígidas").

Uma característica importante desta técnica de fase sólida é que os antígenos ou anticorpos podem ser facilmente ligados a superfícies por adsorção passiva, este processo é geralmente chamado de revestimento. A maioria das proteínas adsorve á superfícies de plástico como resultado de interações hidrofóbica entre subestruturas de proteína não polares e a matriz de plástico. As interações são independentes da carga média da proteína e, assim, cada proteína tem uma diferente constante de ligação. A velocidade e extensão do revestimento dependem: i) do coeficiente de difusão da molécula de fixação; ii) da razão entre a área da superfície a ser revestida

com o volume da solução de revestimento; iii) da concentração da substância a ser adsorvida; iv) da temperatura; v) do tempo de adsorção. Todos estes factores estão relacionados, e são fundamentais para determinar a concentração óptima de antigénio/anticorpo de revestimento em cada um dos sistemas, por titulações apropriadas (CROWTHER, 2005).

As principais vantagens da técnica de ELISA são a simplicidade e leitura fácil da técnica, a rapidez (em poucas horas podem ser realizados os testes), os níveis de sensibilidade de detecção de 0,01 a 1 µg/ mL, são fácil e fidedignamente realizáveis, as despesas com os custos iniciais são baixas, a segurança e aceitação dos resultados pela comunidade científica

Dentro dos métodos EIA heterogéneos, existem vários tipos de métodos de ELISA que diferem no procedimento analítico (competitivo ou não competitivo) e do tipo de reagente marcado (antigénio ou anticorpo). Será aqui apresentado um exemplo da aplicação de uma das técnicas, a mais usada por vários *Kits* comerciais para doseamento da CgA.

1.4.3.1. ELISA na quantificação da CgA

Na técnica de *sandwich* de dois locais com dois anticorpos selecionados que se ligam a diferentes epítomos de Cg A humana, os padrões, os controlos do ensaio e as amostras do paciente são adicionados directamente aos poços de microtitulação da microplaca que foi revestida com um anticorpo policlonal anti-CgA. Após o primeiro período de incubação, o anticorpo na parede do poço de microtitulação captura a CgA humana na amostra e as proteínas não ligadas em cada poço de microtitulação são removidas na lavagem.

Posteriormente, é adicionado a cada poço de microtitulação um anticorpo monoclonal de CgA humana marcado com PRR e ocorre a formação de uma *sandwich* de “anticorpo monoclonal- CgA - anticorpo policlonal de CgA humana”. O anticorpo monoclonal não ligado é removido na fase de lavagem subsequente. Para a detecção deste imunocomplexo, o poço é então incubado ao abrigo da luz numa reacção cronometrada com o substrato, uma solução de tetrametilbenzidina (TMB) com peróxido de hidrogénio. O TMB actua como dador de protões para a redução do peróxido de hidrogénio em água pela enzima HRP e dímero resultante faz com que

a solução assuma uma cor azul. A progressão da cor é interrompida pela adição de uma solução de ácido sulfúrico em TMB (solução de paragem) o que torna a amostra amarela e ao fim de um intervalo de tempo definido, a microplaca é lida num leitor espectrofotométrico a 450nm.

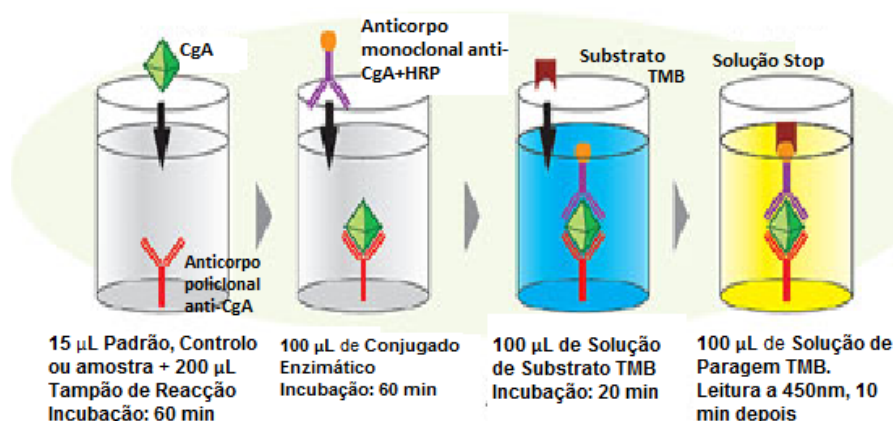


Figura 1.8 – Figura esquemática de uma ELISA sandwich para detecção de CgA (IBLELISA).

A actividade enzimática do imunocomplexo ligado à Cg A na parede do poço de microtitulação é directamente proporcional à quantidade de CgA presente na amostra. É gerada uma curva padrão ao representar-se graficamente a absorvância *versus* a concentração respectiva de CgA humana para cada padrão, num ajuste ponto por ponto da escala cúbica ou da curva de 4 parâmetros. A concentração da CgA humana nas amostras de teste é determinada directamente a partir desta curva padrão por interpolação (figura 1.9).

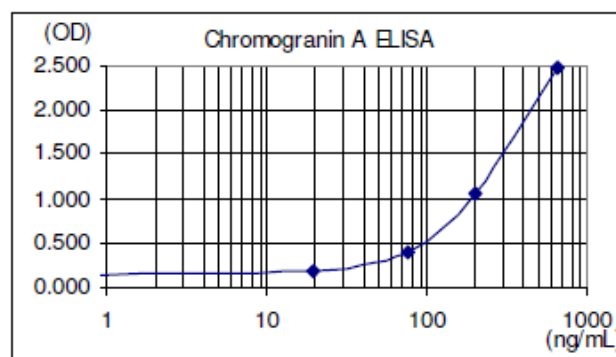


Figura 1.9 - Exemplo de uma curva-padrão, construída a partir da densidade optica (OD) dos padrões (eixo dos yy, linear) em função da sua concentração (eixo dos xx, logarítmico), quer em papel gráfico semi-logarítmico quer usando um método computadorizado. A concentração das amostras pode ser lida directamente a partir da curva de calibração (IBLELISA).

Este sistema de placas possibilita a realização do ensaio de forma a assegurar a uniformidade de todas as etapas tanto para as amostras como para os calibradores (fiabilidade dos dados).

1.5. Objectivo

Tendo a CgA sido apresentada como um marcador promissor a nível da monitorização, diagnóstico e avaliação de mortalidade na Insuficiência Cardíaca, é intuito deste trabalho fazer uma revisão dos ensaios comerciais e das publicações existentes a este respeito. Serão abordadas questões de fisiologia, aplicações clínicas já definidas, metodologias para a sua detecção e a aplicação à situação específica da IC.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Material e Métodos

A pesquisa dos métodos comerciais disponíveis e das publicações existentes referentes ao tema realizou-se entre 20 de Outubro de 2011 e 30 de Outubro de 2012, recorrendo-se para tal à base de dados da *PubMed/MEDLINE*, *e-medicine*, *Interscience*.

As palavras-chave utilizadas foram: *Insuficiência Cardíaca (IC)*; *Cromogranina A (CgA)*; *Radioimunoensaio (RIA)*; *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*.

Procedeu-se posteriormente à selecção dos artigos desde 2000 a 2012 em língua inglesa e portuguesa, tendo-se ainda utilizado os artigos referenciados noutros trabalhos. Foram incluídos artigos que visam a comparação dos dois métodos e/ou a importância da CgA como marcador diferencial de diagnóstico em diversas patologias. Recorreu-se também a alguns livros da área da Medicina Interna, Cardiologia e Imunologia.

Foram consultadas as seguintes bulas dos *Kits* disponíveis comercialmente:

- . CGA-RIA CT; CIS bio international, Gif-sur-Yvette cedex, France (RIACIS);
- . DAKO Chromogranin A ELISA kit; DAKO A/S, Glostrup, Denmark (DAKO);
- . CgA RIA (Ref:RB 321); EuroDiagnostica, Malmö, Sweden (ED);
- . Chromoa ELISA; CIS bio international, Gif-sur-Yvette cedex, France (CISELISA);
- . CGA-RIACT, Fardiotop (RIAFARD);
- . Hu Chromogranin A–ELISA, DIAsource ImmunoAssays S.A., Belgium (DIAELISA);
- . Chromogranin A RIA; IBL International GMBH, Hamburg, Germany (IBLELISA);
- . Chromogranin A ELISA; IBL International GMBH, Hamburg, Germany (IBLRIA).

2.2. Resultados

Os resultados da revisão bibliográfica, são apresentadas nas seguintes tabelas:

Tabela 2.1 - Características dos ensaios (*kits*) disponíveis comercialmente, mais utilizados para determinação da concentração de CgA pelo método ELISA: valores de referência, colheita, conservação da amostra, anticorpos específicos, fragmento de CgA contra o qual é produzido o anticorpo específico.

Tabela 2.2 - Características dos ensaios (*kits*) disponíveis comercialmente, mais utilizados para determinação da concentração de CgA pelos métodos RIA/IRMA: valores de referência, colheita, conservação da amostra, anticorpos específicos, fragmento de CgA contra o qual é produzido o anticorpo específico.

Tabela 2.3 - Resumo de alguns estudos que abordam a quantificação da CgA pelos métodos RIA/IRMA e ELISA, e que têm por objectivo específico comparação de métodos ou a importância da CgA como marcador de diagnóstico em várias patologias: autor e ano de publicação, número de participantes no estudo, colheita e armazenamento das amostras, técnicas utilizadas para quantificação da CgA e principais conclusões dos estudos.

Não foram encontrados estudos de comparação de métodos relativos à CgA em contexto de IC.

Por uma questão prática, não serão aqui diferenciados os métodos de RIA e IRMA por se tratar de métodos muito semelhantes como já foi descrito anteriormente e para seguir a mesma linha que os artigos aqui apresentados, que também não os distinguem na sua análise de resultados

Tabela 2.1 - Características dos ensaios (*kits*) disponíveis comercialmente mais utilizados para determinação da concentração de CgA pelo método ELISA: valores de referência, colheita, conservação da amostra, anticorpos específicos, fragmento de CgA contra o qual é produzido o anticorpo específico.

Kit ELISA	Valores de Referência (indep. de idade/sexo)	Colheita	Conservação da Amostra	Fragmento de CgA	1º Atc / 2º Atc
DAKO-ELISA (DAKOELISA)	2 - 18 U/L	Plasma EDTA Plasma Heparina	2-8°C <7 dias -20°C <6 meses	C-terminal de 23 kDa	Policlonal / Policlonal
Hu CromogELISA DIAsource (DIAELISA)	< 100 ng/mL	Soro	2-8°C <1dia -20°C >1 dia	n/d	Policlonal / Monoclonal
Chromog.A IBL-International (IBLELISA)	< 100 ng/mL	Plasma EDTA Soro	15-18°C <72 horas -20°C <6 meses	n/d	Policlonal / Monoclonal
Chromoa ELISA CISBIO (CISELISA)	27 - 94 ng/mL	Soro	2-8°C <1dia -20°C >1 dia	Amino-ácidos 145-245	Monoclonal / Monoclonal

Tabela 2.2 - Características dos ensaios (*kits*) disponíveis comercialmente mais utilizados para determinação da concentração de CgA pelo método RIA/IRMA: valores de referência, colheita, conservação da amostra, anticorpos específicos, fragmento de CgA contra o qual é produzido o anticorpo específico.

Kit RIA/IRMA	Valores de Referência (indep. da idade/sexo)	Colheita	Conservação da Amostra	Fragmento de CgA	1º Atc / 2º Atc
CGA-RIACT Fardiotop (RIAFARD)	19 - 98 ng/ml	Soro	2-8°C <1dia -20°C >1 dia	n/d	Monoclonal / Monoclonal
CGA-RIA CT CISBIO (CISRIA)	10 – 100 ng/ml <hr/> 20 – 150 ng/ml	Soro <hr/> Plasma EDTA	2-8°C <1dia -20°C >1 dia	Amino-ácidos 145-245	Monoclonal / Monoclonal
IBL-International (IBLRIA)	< 4.0 nmol/L	Plasma Heparina	2-4°C < 3 horas -20°C >1 dia	Amino-ácidos 116-439	Policlonal / Policlonal
CgA RIA EuroDiagnostica (EDRIA)	< 6.0 nmol/L	Soro ou Plasma	2-4°C < 3 horas -20°C >1 dia	Amino-ácidos 116-439	Policlonal / Policlonal

Tabela 2.3 - Resumo de alguns estudos que abordam a quantificação da CgA pelos métodos RIA/IRMA e ELISA, e que têm por objectivo específico comparação de métodos ou a importância da CgA como marcador de diagnóstico em várias patologias: autor e ano de publicação, número de participantes no estudo, colheita e armazenamento das amostras, técnicas utilizadas para quantificação da CgA e principais conclusões dos estudos.

Autor/ ano	Interesse	Participantes	Colheita /Armazenamento	RIA	ELISA	Conclusões
<i>Stridsberg</i> 2003	Tumores Neuroendocrinos (TNE) Comparação de métodos	46 com TNE 31 sem esta patologia	Plasma com Heparina Centrifugado a 3000g/30 min Armazenado a - 20°C.	CISRIA EDRIA	DAKO ELISA	-Sensibilidade e Especificidade difere entre os 3 <i>kits</i> . -Correlação significativa entre os três <i>kits</i> ; contudo, os <i>kits</i> da DAKO e da ED mostraram uma correlação mais próxima entre si, do que o <i>kit</i> da CIS. -Diferentes métodos obtem resultados diferentes.
<i>Zatelli</i> 2007	Importância da CgA no diagnóstico de TNE gastroenteropancreáti- cos.(GEP)	129 sem patologia 273 c/ TNE,dos quais 123c/ metastases	Soro e plasma 12h de jejum. Armazenado a -80°C	CISRIA	DAKO ELISA	-Boa correlação RIA/ELISA - A técnica ELISA apresentou maior especificidade e sensibilidade na detecção da CgA, embora nenhuma delas tenha revelado especificidade e sensibilidade suficientes para demonstrar que a CgA é um marcador eficiente no diagnóstico de TNE em GEP

Tabela 2.3 - Resumo de alguns estudos que abordam a quantificação da CgA pelos métodos RIA/IRMA e ELISA, e que têm por objectivo específico comparação de métodos ou a importância da CgA como marcador de diagnóstico em várias patologias: autor e ano de publicação, número de participantes no estudo, colheita e armazenamento das amostras, técnicas utilizadas para quantificação da CgA e principais conclusões dos estudos (cont.)

Autor/ ano	Interesse	Participantes	Colheita /Armazenamento	RIA	ELISA	Conclusões
<i>Zitella</i> 2007	Diferenciação de TNE em Hiperplasia Benigna da Próstata (HBP) ou Cancro de Próstata (CP) Comparação de métodos	170 c/ HBP 107 c/ HBP + inflamação 136 sem patologias	Soro e Plasma 12 horas de jejum Armazenado a -20°C.	CISRIA	DAKO ELISA	Os resultados obtidos com os 2 ensaios em doentes CP e HBP mostraram uma taxa de discordância significativa, sugerindo os 2 kits podem obter informações diferentes.
<i>Appetecchia</i> 2010	Diferenciação de Adenocarcinoma da Próstata não metastizada.	486 (Vários critérios de inclusão)	Colheita 3 semanas antes de intervenção cirúrgica em jejum de 12 horas. Plasma EDTA. Armazenado a -20°C.	CISRIA	DAKO ELISA	CgA pode complementar teste de PSA numa fase precoce de Adenocarcinoma da Próstata.

Tabela 2.3 - Resumo de alguns estudos que abordam a quantificação da CgA pelos métodos RIA/IRMA e ELISA, e que têm por objectivo específico comparação de métodos ou a importância da CgA como marcador de diagnóstico em várias patologias: autor e ano de publicação, número de participantes no estudo, colheita e armazenamento das amostras, técnicas utilizadas para quantificação da CgA e principais conclusões dos estudos (cont.)

Autor/ ano	Interesse	Participantes	Colheita /Armazenamento	RIA	ELISA	Conclusões
<i>Glinicki</i> 2010	Comparação directa do resultado das concentrações de CgA no soro e plasma por RIA/IRMA e ELISA	<u>POR IRMA:</u> 122 plasma EDTA 122 soro <u>POR IRMA +ELISA:</u> 20 plasma EDTA 20 soro 25 plasma Heparina 25 plasma EDTA 8 plasma Heparina 8 plasma EDTA 8 soro	Plasma Heparina plasma EDTA soro Armazenado a -20°C	CISRIA	CISELISA	Diferenças significativas nas concentrações de CgA doseadas em plasma e soro, quer por RIA quer por ELISA. Sem diferenças significativas na concentrações de CgA em plasma EDTA e plasma Heparina
<i>Ramachandran</i> 2012	TNE Comparação de métodos	125 com TNE 108 sem patologia 41 com neoplasia não neuroendócrina.	Plasma EDTA	EDRIA SAS	DAKO ELISA CISELISA	Resultados negativos em suspeitas de Neoplasia Neuroendócrina, devem ser repetidos por outro ensaio que reconheça um epitopo de CgA diferente.

3 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Têm sido realizados vários estudos para quantificar a CgA intacta e os seus produtos de clivagem para aplicação clínica. Nos últimos anos o número desses estudos tem aumentado devido ao desenvolvimento de diferentes *Kits* comerciais disponíveis no mercado. No entanto, a comparação de resultados entre eles apresenta várias dificuldades, pois para além de diferirem no próprio método em si (RIA/IRMA ou ELISA), utilizam diferentes anticorpos, diferentes padrões e expressam os resultados em diferentes unidades. Também as recomendações de cada fabricante relativamente à colheita e conservação da amostra apresentam diferenças bem como em relação à preparação recomendada do doente.

Nas tabelas 2.1 e 2.2, é apresentada como resultado da pesquisa, a comparação entre as características dos *kits* mais utilizados.

A sua observação leva a várias considerações:

i) Relativamente à colheita de sangue há fabricantes que recomendam o uso de um anticoagulante (EDTA ou Heparina) para a obtenção de plasma, outros que recomendam o uso de tubo “seco” ou com um activador de coágulo para a obtenção de soro, havendo alguns que recomendam o uso indiferente de qualquer um deles e ainda quem apresente incompatibilidade com a utilização de anticoagulantes. Por exemplo, o *kit* da EDRIA recomenda soro ou plasma sem especificar qual dos anticoagulantes usar e o DAKOELISA sugere plasma independentemente do anticoagulante.

Os valores normais devem ser adaptados consoante se use soro ou plasma colhido com EDTA ou heparina, pois sendo a CgA uma proteína de ligação ao cálcio que pode agregar a elevadas concentrações de iões Ca^{2+} livres, os resultados da sua medição podem ser afectados pela presença destes iões. A anticoagulação ocorre por meio da ligação de iões de Ca^{2+} e da inibição da acção da trombina. Nas amostras de sangue venoso para a obtenção de soro que contêm um activador de coágulo, os iões de cálcio permanecem livres. É suposto que a possível razão para as diferenças detectadas seja uma parcial agregação de CgA no ambiente de iões de cálcio livres no soro e que pode ser evitada com a presença de EDTA ou heparina na amostra. (GLINICKI,2010)

Pode-se observar que apenas um dos *kits*, o CISRIA, que sugere o uso indiferente de soro ou plasma EDTA, tem o cuidado de apresentar intervalos de

referência diferentes para cada caso: 10–100 ng/ml baseados no cálculo a partir de uma população de 162 voluntários saudáveis para o soro e 20–150 ng/mL para plasma EDTA com base numa população de 50 indivíduos saudáveis.

ii) No que diz respeito aos intervalos de referência, eles são apresentados em diferentes unidades (ng/mL, U/L e nmol/L), de difícil conversão para a mesma unidade por não se saber com facilidade as fórmulas matemáticas que permitem a equivalência de peso e massa para esta molécula especificamente.

Pela observação das tabelas 2.1 e 2.2, encontram-se também diferenças no intervalo de tempo e temperatura desde o momento da colheita até à sua congelação, havendo desde *kits* que admitem a estabilidade da amostra à temperatura ambiente durante 3 dias (IBLELISA) até aqueles que aconselham a sua conservação a 2 a 4°C até à congelação ao fim de um dia (EDRIA E IBLRIA).

Em relação à temperatura de congelação há unanimidade (-20 °C), variando apenas o tempo limite que alguns admitem ser 6 meses (IBLELISA e DAKOELISA) e os outros não referem nada a este propósito. A CgA tem uma imunoreactividade bastante estável, demonstrando resistência a acções de incubação a 37° C até 4 dias de congelação e descongelação (O'CONNOR,1989). Todos os *kits* aconselham que devem ser evitadas repetidas acções de congelação e descongelação das amostras por mais de três vezes.

iii) Relativamente aos anticorpos específicos, observa-se que são usados anticorpos monoclonais e policlonais, tanto como anticorpo primário como secundário e existem quase todas as combinações, variando o fragmento de CgA contra o qual é produzido o anticorpo específico.

Sendo a CgA um marcador importante de tumores neuroendócrinos, os *kits* disponíveis para o seu doseamento privilegiam o uso de anticorpos contra fracções de CgA, que embora detectem a CgA intacta, são concebidos para terem a possibilidade de detectar também fragmentos como a Pancreastatina (CgA 250–301).

Alguns dos fragmentos de CgA que têm influência na IC como as Vasostatinas (CgA 1-76 e CgA 1-113) e a Serpinina (fração C-terminal de CgA) não são detectados pela maioria dos *kits*. Além disso, por exemplo o *kit* da DAKOELISA utiliza uma fracção purificada de CgA da urina de pacientes com tumores carcinóides como anticorpo direccionado contra a CgA, o que o torna mais específico para detecção desta patologia.

Por todas estas razões, cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo de referência de acordo com o tipo de amostra e *kit* utilizado.

Na tabela 2.3, é apresentado o resumo de alguns dos estudos consultados ao longo da elaboração deste trabalho, que utilizaram os dois diferentes métodos RIA/IRMA e ELISA, tanto com o objectivo de fazer explicitamente estudos comparativos entre eles, como noutros casos para concluir acerca da especificidade e sensibilidade da CgA relativamente às patologias que pretendiam estudar, não tendo sido encontrados estudos de comparação de métodos relativos à IC.

Em 2003, *Stridsberg* e os seus colaboradores publicaram um estudo intitulado “*A comparison between 3 commercial kits for CgA measurements*” no qual compararam três *kits* comerciais, o CISRIA, o DAKOELISA e o EDRIA, comentando e discutindo as vantagens de cada um na aplicação prática da quantificação da CgA. Foi colhido sangue em tubos com heparina e o plasma foi usado em todos os ensaios, contrariando a recomendação do CISRIA, mas de acordo com os outros dois *kits*. Quanto à conservação da amostra e ao tempo que mediou a recolha da amostra e a sua congelação, o artigo é omissivo, referindo no entanto que a congelação foi feita à temperatura recomendada por todos os *kits*, -20°C.

Os três *kits* diferem na *standardização* e nas unidades em que expressam os resultados. O *kit* CISRIA utiliza uma CgA humana recombinante produzida em *E. coli* e a concentração é expressa em ng/mL. O *kit* da DAKOELISA, utiliza um fragmento C-terminal de 23 kDa da CgA e utiliza as concentrações expressas em U/ L. No *kit* EDRIA é utilizada uma fracção purificada de CgA da urina de pacientes com tumores carcinóides, sequência de aminoácidos de CgA 116-439, e a concentração é expressa em nmol/ L. Após o tratamento estatístico dos resultados, os autores concluíram que existe uma correlação significativa entre os três *kits*, contudo, os *kits* DAKOELISA e EDRIA mostraram uma correlação mais próxima entre si, do que com o *kit* CISRIA. Os valores percentuais relativos à sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e *cut-off* obtidos por *Stridsberg et al*, são apresentados na tabela 2.4 onde se pode observar que o melhor compromisso entre sensibilidade e especificidade foi o EDRIA. Os autores concluíram que as diferentes propriedades dos três *kits* resultaram em diferentes *performances*, um facto que deve ser tido em consideração sempre que se comparem resultados de diferentes estudos clínicos.

Tabela 3.1 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (V.P.P.), valor preditivo negativo (V.P.N.) e *cut-off* para os 3 kits comerciais estudados por *Stridsberg et al, 2003*.

	<i>Sensibilidade (%)</i>	<i>Especificidade (%)</i>	<i>V.P.P (%)</i>	<i>V.P.N. (%)</i>	<i>Cut-off</i>
CISRIA	67	96	97	63	< 99 ng/mL
DAKO ELISA	85	85	91	76	<19 U/L
EDRIA	93	88	93	88	< 4 nmol/L

Para estudar a importância da CgA no diagnóstico de tumores neuroendócrinos (TNE) gastroenteropancreáticos (GEP), *Zatelli* e os seus colaboradores em 2007, levaram a cabo um estudo com 273 participantes com TNE, dos quais 123 com metástases, e um grupo controlo de 129 participantes, utilizando o mesmo *kit* que *Stridsberg* para ELISA e o CISRIA para RIA. Apresentaram os resultados que estão na tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Sensibilidade, especificidade e *Cut.off* encontrados para diferenciação entre o grupo controlo e participantes com doença activa, diferenciação entre TNE com e sem metástases (valores desenvolvidos por *Zatelli, M., 2007*).

CISRIA	<i>Cut-off (ng/mL)</i>	<i>Sensibilidade (%)</i>	<i>Especificidade (%)</i>
Controlos/ Doença activa	53	71,3	71
Com Metastases/ Sem metastases	146	57	55,6

DAKOELISA	<i>Cut-off (U/L)</i>	<i>Sensibilidade (%)</i>	<i>Especificidade (%)</i>
Controlos/ Doença activa	16	84	85
Com Metastases/ Sem metastases	67,3	63,3	71,4

A correlação entre as duas técnicas foi considerada boa e a técnica ELISA apresentou maior especificidade e sensibilidade na detecção da CgA, embora nenhuma delas tenha revelado especificidades e sensibilidades suficientes para demonstrar que a CgA é um marcador eficiente no diagnóstico de TNE em GEP.

Estes autores seguiram o conselho dado por todos os fabricantes de que cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo de referência ou valor de *cut-off* adaptado às circunstâncias da população que pretendem estudar e encontraram valores diferentes dos citados pelos fabricantes. De acordo com estudos prévios sabe-se que a sensibilidade e especificidade da CgA como biomarcador depende do valor do *cut-off* e que usar um *cut-off* mais baixo causa uma sensibilidade mais elevada mas uma especificidade mais baixa e vice-versa (Nölting S. 2012), o que se verifica no estudo *Zatelli* feito no âmbito de TNE, como se pode ver na tabela 3.2. tanto com o DAKOELISA como com o CISRIA. Cada fabricante sugere um intervalo de referência normalmente visando a CgA apenas como marcador de TNE. Por exemplo o *kit* IBLELISA, que com base nos resultados do estudo de uma população de 40 participantes de ambos os sexos e idade compreendida entre os 19 e 57 anos, sugere que as concentrações pertencentes ao intervalo 4.0-10.0 nmol/L indicam uma suspeita de tumor neuroendócrino e devem ser controladas com recolha de novas amostra e posterior repetição do ensaio. Os níveis superiores a 10.0 nmol/L podem indiciar uma forte suspeita de tumor neuroendócrino.

Há casos de níveis elevados de CgA sem estarem associados a casos tumorais, como por exemplo, em doentes com disfunção renal, gastrite atrófica, em pacientes sujeitos a tratamento com fármacos inibidores da bomba de prótons (GLINICKI, 2010).

De acordo com a questão central deste trabalho, os valores de CgA também se apresentam elevados em casos de IC, mas ainda não existe na literatura uma sugestão para intervalo de referência para valores normais associados especificamente a esta patologia.

Foi publicado um estudo por *Zitella et al*, cujo objectivo era também comparar dois métodos diferentes, RIA/IRMA e ELISA, na avaliação da CgA como marcador capaz de diferenciar tumores neuroendócrinos (TNE) na Hiperplasia Benigna da Próstata (HBP) e Cancro de Próstata (CP). Foram utilizados dois dos mesmos *kits* que no estudo de *Stridsberg et al*, o CISRIA e o DAKOELISA.

Concluíram, e de acordo com *Stridsberg*, que a CgA doseada por estes *kits* revela uma taxa de discordância significativa entre si, o que sugere mais uma vez que podem proporcionar diferentes informações. Neste estudo, apesar de não ser mencionado qual o anticoagulante usado para a obtenção de plasma, encontraram previamente o seu próprio *cut-off* para cada um dos métodos, utilizando uma *pool* de plasmas proveniente de uma população saudável de meia-idade do sexo masculino. Igual procedimento foi usado para os soros, o que ajuda a ultrapassar a diferença que poderia ser gerada por uma interpretação de resultados directa relativamente ao uso de soro ou plasma.

Ainda a este propósito, o trabalho apresentado em 2010 por *Glinicki* elucida sobre esta questão ao publicar os resultados da comparação das concentrações de CgA no soro, plasma EDTA e plasma Heparina por RIA/IRMA e ELISA, usando respectivamente os CISRIA e CISELISA. Estes dois *kits* utilizam as mesmas unidades (ng/mL) o que permite uma comparação directa, os padrões são ambos obtidos a partir de CgA recombinante e os anticorpos monoclonais reconhecem o mesmo domínio central da molécula intacta de CgA (CgA 145-245) e provavelmente alguns dos seus fragmentos circulantes. As concentrações CgA foram maiores no plasma do que no soro. Relativamente ao método de RIA/IRMA e para a totalidade das amostras estudadas, a diferença do valor de CgA no intervalo entre 10-100 ng/mL foi de 20 a 70%, no intervalo de 101 a 300 ng/mL, de 12-60% e no de 301 a 1076 ng/mL foi de 14–40%. As diferenças entre os resultados no soro e plasma usando ELISA foram semelhantes, mas um pouco menores. Não houve diferença significativa entre os níveis CgA em plasma EDTA e plasma heparinizado, e os resultados das medições realizadas por RIA/IRMA e ELISA, na maioria dos casos, foram semelhantes. Para o grupo controlo os resultados podem ser observados na figura 3.1.

CISRIA			CISELISA		
Plasma-EDTA	Plasma-heparin	Serum	Plasma-EDTA	Plasma-heparin	Serum
x = 46 ng/mL SD = 17 median = 49	x = 43 ng/mL SD = 15 median = 47	x = 33 ng/mL SD = 13 median = 34	x = 38 ng/mL SD = 13 median = 35	x = 42 ng/mL SD = 12 median = 41	x = 27 ng/mL SD = 14 median = 19
↓ 2-6% 28-76%			↓ 3-9%* 22-68%		

Figura 3.1 - Concentrações medidas em plasma-EDTA, plasma heparina e no soro de grupo voluntário saudável pelos kits CiSRIA e CISELISA, (adaptado de Glinicki 2010).

Para além da explicação já dada no início deste capítulo para o facto de haver diferenças relativamente ao uso de soro ou plasma, estes autores avançam com uma hipótese adicional de que alguns pequenos fragmentos de CgA podem ser eventualmente capazes de se ligar a partículas do activador de coágulo usado para obter soro.

Mais recentemente, em 2012, *Ramachandran* e os seus colaboradores efetuaram uma comparação de métodos utilizando dois kits diferentes de RIA/IRMA e dois de ELISA, também com o objectivo de avaliar a CgA como um marcador preciso de TNEs. Este estudo teve sempre em consideração o facto de a CgA poder ter diferentes formas moleculares em diferentes tecidos, e portanto os locais de ligação anticorpo – epítomos serem também diferentes. Por isso os kits foram propositadamente escolhidos para que fossem usados anticorpos contra diferentes fracções de CgA. Assim, foram eleitos três kits comerciais, CISELISA (CgA 145-245), DAKOELISA (CgA C-terminal), EDRIA (CgA 116-439) e um kit manufacturado pelo *Imperial Supra-regional Assay Service Radioimmunoassay*, o SAS, que é um radioimunoensaio competitivo e utiliza um anticorpo policlonal dirigido contra a CgA 250-301 (figura 3.2). Este último fragmento corresponde ao péptido biologicamente activo Pancreastatina.

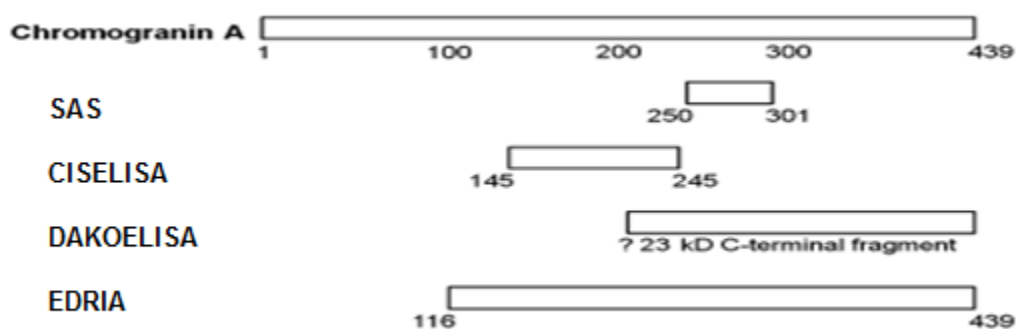


Figura 3.2 - Representação esquemática da molécula Cg A e epitopos contra os quais os anticorpos foram criados para os ensaios SAS, CISELISA, DAKOELISA e EDRIA (adaptado de Ramachandran *et al*, 2012).

Embora todos os quatro ensaios tivessem demonstrado precisão diagnóstica comparável para TNE quando usados de forma independente, houve diferenças significativas na concordância entre os ensaios. Isto sugere que as populações de pacientes com TNE reconhecido pelos quatro ensaios variaram. Um resultado negativo obtido por um ensaio, deve ser confirmado por um outro ensaio diferente, não só para o diagnóstico, mas também para o subsequente seguimento de cada doente. Entre eles, o ensaio que melhor detecte as formas de CgA segregadas por um determinado paciente, deve então ser utilizada para todo o acompanhamento posterior (RAMACHANDRAN, 2012).

Os ensaios CIS e SAS foram os menos concordantes e os mais significativos marcadores de diagnóstico na análise de regressão logística múltipla, portanto, esta combinação é a que provavelmente detecta mais formas diferentes de CgA.

Quanto á preparação do doente, todos estes estudos referem que a colheita de sangue foi efectuada de manhã após jejum de 12 horas para prevenir eventuais factores interferentes. Está descrito que as concentrações de CgA podem ser mais elevadas cerca de 20-25% ao fim da tarde e à noite e que o efeito de exercício físico é desprezível mesmo em doentes com hipertensão essencial. Uma refeição pode estimular as células do estômago e induzir a libertação de gastrina e CgA (GLINICKI, 2010). São também exemplos de factores interferentes, capazes de produzir falsos positivos, a gravidez, o tratamento com drogas inibidoras de bomba de prótons, presença de IgM do factor reumatóide, hipergastrinemia, hipertensão não controlada (RAMACHANDRAN, 2012).

No seu estudo para avaliar a CgA na diferenciação TNE em Adenocarcinoma da Próstata não metastizado, *Appetecchia* e os seus colaboradores, criaram vários critérios de inclusão e exclusão para os participantes do estudo, que além de todos os factores acima citados, incluía ainda a exigência de que os participantes não tivessem sido previamente sujeitos a radio ou hormonoterapia.

Para além destes factores interferentes a nível clínico, também existem factores a nível laboratorial, como é referido nas bulas dos *kits*, e que podem ser observados no soro ou plasma: hemólise, hiperlipémia, turvação, presença de fibrina. No caso de se utilizar a técnica ELISA, é também recomendado que não sejam usados nunca agentes antimicrobianos para preservação da amostra, pois interferem com os substratos. Nos estudos apresentados, nenhum autor referiu se houve exclusões por factores interferentes a nível laboratorial.

A CgA é uma proteína ubiquitária, utilizada actualmente como um importante biomarcador para todos os tumores neuroendócrinos, sendo também apontada como provável biomarcador de prognóstico em contexto de IC aguda num futuro próximo, pela sua capacidade de avaliar a actividade do sistema nervoso simpático. Para que a sua aplicação cumpra esse objectivo, além de serem precisos mais estudos na área clinica, também a área laboratorial poderá contribuir para a avaliação adequada dos resultados do doseamento da CgA, o que requer um bom conhecimento dos factores e das condições que podem potencialmente influenciar os resultados. São exemplo o uso de anticoagulantes, o anticorpo específico contra a CgA, condições de armazenamento e colheita.

Métodos muito sensíveis como RIA e ELISA são os mais utilizados para a determinação quantitativa da CgA, no entanto apresentam dificuldades de comparação de resultados entre si. Além de poderem diferir nos factores acima mencionados, o que resulta em diferentes eficiências, podem também variar nos valores de referência que apresentam.

Uma standardização de um método reconhecido a nível mundial seria um passo para a uniformização do doseamento da CgA. No entanto, o desenho do ensaio e a selecção de anticorpos específicos, provavelmente melhorará os resultados para a sua aplicação em contexto de IC.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4. Referências Bibliográficas

ANGELONE, T.; MAZZA, R.; CERRA, M.C. - Chromogranin-A: A Multifaceted Cardiovascular Role in Health and Disease. Current Medicinal Chemistry. Vol.19 (2012). p. 4042-4050

APPETECCHIA Marialuisa; MEÇULE Aurela; PASIMENI Giuseppe; IANNUCCI Concetta; DE CARLI Piero; BALDELLI Roberto - Incidence of high chromogranin A serum levels in patients with non metastatic prostate adenocarcinoma. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research (2010), 29:166

BERGAMINI, Corinna; CICOIRA, Mariantonietta; ROSSI, Andrea; VASSANELLI, Corrado – Oxidative stress and hyperuricemia: pathophysiology, clinical relevance and therapeutic implications in chronic heart failure. European Journal of Heart Failure. ISSN 10.1093/eurjhf/hfp042. Vol. 11. (2009), p.444-452.

BETTENCOURT, Paulo - Clinical usefulness of B-type natriuretic peptide measurement: present and future perspectives. ISSN 10.1136/hrt.2005.063784. Vol.91, nº11 (2005). p.1489-1494

BRAUNWALD, Eugene – Biomarkers in Heart Failure. The New England Journal of Medicine. ISSN 10.1056/NEJMr0800239. Vol. 358 (2008). p. 2148-2159.

BURTINS CA, Ashwood ER, Bruns DE (2008) Tietz Fundamentos de Química Clínica, tradução da 6ª edição. Elsevier Editora.

CECONI, C.; FERRARI, R.; BRACHETTI, T.; OPASICH, C.; VOLTERRANI, M.; COLOMBO, B.; PARRINELLO, G.; CORTI, A. – Chromogranin A in heart failure: a novel neurohumoral factor and a predictor for mortality. European Heart Journal. ISSN 10.1053/euhj.2001.2977. Vol. 23, nº12 (2002). p. 967-974.

CHEN, Wei-Chung; TRAN, Kimberly – Biomarkers in Heart Failure. Heart and Education in Heart. ISSN 10.1136/hrt.2008.151639. Vol. 96 (2010). p. 314-320.

CLERICO, A.; VITTORINI, S.; PASSINO, C.; EMDIN, M. (2009). New and emerging biomarkers of heart failure. Critical Reviews in Clinical Laboratory Science. Vol. 46, nº3 (2009). p. 107-128.

CORTI, Angelo – Chromogranin A in Tumor and vascular Biology. Cell Biology of the chromaffin Cell. Instituto Teófilo Hernando, Spain. (2004) p.117-128.

CROWTHER John R. , Elisa: Theory and Practice (Methods in Molecular Biology), (2005)
EDITORIA: HUMAN PRESS

DELVES Peter J., Seamus J. Martin , Dennis R. Burton , Ivan M. Roitt - Roitt's - Essential Immunology – (2011) , -Editora Wiley-Black Well

DENARDI, Celise; FILHO, António; CHAGAS, António – A Proteína C-Reativa na Atualidade. Revista SOCERJ. Vol.21, nº5 (2008). p.329-334.

DUNN, Brigitte; COHN, David - Chromogranin A-derived parastatin peptides as autocrine inhibitors of endocrine secretion. Cell Biology of the chromaffin Cell. Instituto Teófilo Hernando, Spain. Vol. 165, nº1 (2002). p. 86-94.

ESTENSEN, Mette; HOGNESTAD, Aina; SYVERSEN, Unni; SQUIRE, Iain; NG, Leong; KJEKSHUS, John; DICKSTEIN, Kenneth; OMLAND, Torbjorn – Prognostic value of plasma chromogranin A levels in patients with complicated myocardial infarction. American Heart Journal. ISSN 10.1016/j.ahj.2006.05.008. Vol.152, nº5 (2006). P. 927.e1-927.e6.

GLICK S - Rosalyn Sussman Yalow (1921–2011)",. (2011) Nature. 474 (7353): 580.

GLINIKI, Piotr; KAPUSCINSKA, Renata; JESKE, Wojciech – The differences in chromogranin A concentrations measured in serum and in plasma by IRMA and ELISA methods. Polish Journal of Endocrinology. ISSN 0423-104X. Vol.61, nº4 (2010). p.346-350.

GLINICKI, Piotr; JESKE, Wojciech – Chromogranin A (CgA) – the influence of various factors in vivo and in vitro, and existing disorders on its concentration in blood. Polish Journal of Endocrinology. ISSN 0423-104X. Vol.61, nº4 (2010). p. 384-387.

GRADIZ Rui, Fisiopatologia Fundamentos e Aplicações, Edições Lidel (2007).I.S.B.N. 978-972-757-429-2

GRUSSON, D.; AHN, A.; ROUSSEAU, M. F. – Biomarkers of inflammation and cardiac remodeling the quest of relevant companions for the risk stratification of heart failure patients is still ongoing. Biochemia medica (Zagreb). Vol. 21, nº3 (2011). p. 254-263.

HELLE, Karen - Chromogranins Functional and Clinical Aspects. Kluwer Academic Publishers New York, Boston. Vol. 482 (2002).

HELLE, Karen - The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. Biological Research. ISSN 10.1017/S146479310400644X. Vol. 79. (2004).p. 769-794.

HELLE, Karen - The chromogranin A-derived peptides vasostatin-I and catestatin as regulatory peptides for cardiovascular functions. Cardiovascular Research. ISSN 10.1093/cvr/cvp266. Vol. 85, nº1 (2010). p. 9-16.

HUNT, Sharon; Abraham, William; CHIN, Marshall; FELDMAN, Arthur – ACC/AHA 2005 Guideline update of the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of American College of Cardiology/ American Heart Association task force on practice Guidelines. Circulation. Vol.112, nº12 (2005). p. 154-235

JANSSON, Anna; RØSJØ, Helge; OMLAND, Torbjørn; KARLSSON, Thomas; HARTFORD, Marianne; FLYVBJERG, Allan; CAIDAHL, Kenneth – Prognostic value of circulating Chromogranin A levels in acute coronary syndromes. European Heart Journal. ISSN 10.1093/eurheartj/ehn513. Vol.30, (2009), p.25-32.

KASPER DL, BRAUNWALD E, FAUCI AS, HAUSER SL, LONGO DL, JAMESON JL.
Harrison Medicina Interna. Volumes I e II. 16ª Edição Rio de Janeiro: McGraw-Hill;
2006

KRONENBERG, M.; SHLOMO, M; POLONSKY, S; LARSEN, R. - eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. 11th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier;2008 pag. 670-680 and 1825-1830

LEQUIN, Rudolf - Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clinical Chemistry. Vol.51, nº12 (2005). p.2415-2418.

LOH, Peng; CHENG, Yong; MAHATA, Sushil - Chromogranin A and Derived Peptides in Health and Disease. Journal of Molecular Neuroscience. ISSN 10.1007/s12031-012-97. Vol.49, nº2 (2012). p. 347-356

MAZZA, Rosa; IMBROGNO, Sandra; TOTA, Bruno – The interplay between Chromogranin A – derived peptides and cardiac natriuretic peptides in cardioprotection against catecholamine evoked stress. Regulatory Peptides. ISSN 10.1016/j.regpep.2012.05.005. Vol. 65, nº1 (2010). p. 86-94.

MYERS, Gary; CHRISTENSON, Robert; CUSHMAN, Mary; BALLANTYNE, Christle - National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines Emerging Biomarkers for Primary Prevention of Cardiovascular Disease. Clinical Chemistry. Vol.55, nº2 (2009). p.378-384.

O'CONNOR, D.T.; BERNSTEIN, K.N. - Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. The New England Journal of Medicine. Vol. 311 (1984). p.764-770.

O'CONNOR, D.T.; DEFTOS, L.J. - Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. The New England Journal of Medicine Vol.314 (1986). p. 1145-1151.

OIKONOMOU, Evangelos; TOUSOULIS, Dimitris; SIASOS, Gerasimos; ZAROMITIDOU, Marina; PAPAVASSILIOU, Athanasios; STEFANADIS, Christodoulos - The Role of Inflammation in Heart Failure: New Therapeutic Approaches. The Hellenic Journal of Cardiology. Vol.52, nº1 (2011). p. 30-40.

OLIVEIRA JR (2002); Biofísica para as Ciências Biomédicas, 1ª edição. Edipucrs, Porto Alegre.

PALAZZUOLI, Alberto - Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure. Vascular Health and Risk Management. Vol.6 (2011). p. 411–418.

PIERONI, Maurizio; CORTI, Angelo; TOTA, Bruno; CURNIS, Flavio - Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function. European Heart Journal. ISSN 10.1093/eurheartj/ehm22. Vol.28, nº9 (2007). p. 1117-1127.

RAMACHANDRAN Radha; BECH Paul; MURPHY Kevin; DHILLO Karim ; MEERAN M.; CHAPMAN Richard S.; CAPLIN Martyn; GHATEI Mohammed A.; BLOOM Stephen - Improved diagnostic accuracy for neuroendocrine neoplasms using two chromogranin A assays. Clinical Endocrinology (2012) 76, 831–836

ROGER, Véronique; GO, Alan; LLOYD-JONES, Donald; ADAMS, Robert; BERRY, Jarret; BROWN, Tod; CARNETHON, Mercedes - Heart disease and stroke statistics-2011 update: a report from the American Heart Association. Circulation. Vol.123, nº4 (2011). p.18-209.

RØSJØ, Helge; HUSBERG, Cathrine; DAHL, Mai; STRIDSBERG, Mats; SJAASTAD, Ivar; FINSEN, Alexandra; CARLSON, Cathrine; ØIE, Erik; OMLAND, Torbjørn - Prognostic value of chromogranin A in chronic heart failure: data from the GISSI-Heart Failure trial. European Journal of Heart Failure. ISSN_10.1093/eurjhf/hfq055. Vol.12 (2010). p. 549–556

SANDERSON, J.E. e TAN, Y.T. (2010). Heart Failure with a Normal Ejection Fraction. Heart Failure in Clinical Practice. Springer. London.

STRIDSBERG, M.; ERIKSSON, B.; JANSON, O.K. - A comparison between three commercial kits for chromogranin A measurements. Journal of Endocrinology. ISSN 0022-0795/03/0177-337. Vol.177, nº 2 (2003). p.337-41.

STEINER, H.J.; WEILER, R.; LUDESCHER, C.; SCHMID, K.W.; WINKLER, H. J. - Chromogranins A and B are co-localized with atrial natriuretic peptides in secretory granules of rat heart. Journal Histochem Cytochem. Vol.38. (1990). p. 38,845-850

TANAKA, Marenao; YOSHIDA, Hideaki; FURUHASHI, Masato; TOGASHI, Nobuhiko; KOYAMA, Masayuki; YAMAMOTO, Satoski; YAMASHITA, Tomohisa - Deterioration of Renal Function by Chronic Heart Failure is Associated with Congestion and Oxidative Stress in the Tubulointerstitium. Internal Medicine. ISSN 10.2169/internalmedicine.50.5925. Vol.50. (2011) p. 2877-2887.

TAUPENOT, L.; HARPER K.L.; O'CONNOR D.T. - The Chromogranin–Secretogranin Family. The New England Journal of Medicine. Vol.348. (2003) p.1134-1149.

TORRE-AMIONE, G. - Immune activation in chronic heart failure. American Journal of Cardiology. Vol. 95 (2005). p. 3C-8C.

TOTA, Bruno; GENTILE, Stefano; PASQUA, Teresa; BASSINO, Eleonora; KOSHIMIZU, Hisatsugu - The novel chromogranin A-derived serpinin and pyroglutaminated serpinin peptides are positive cardiac β -adrenergic-like inotropes. *FASEB Journal*. Vol.26 (2012). p.2888-2898

VILLABONA, C. - Cromogranina A: un panorama general y perspectivas futuras. Endocrinología y Nutrición. Vol.55. (2008). p.9-20.

VILLACORTA, Humberto; DUARTE, Adriana; DUARTE, Neison Marques; CARRANO, Ângela; MESQUITA, Evandro Tinoco - Valor do Peptídeo Natriurético do Tipo B no Diagnóstico de Insuficiência Cardíaca Congestiva em Pacientes Atendidos com Dispnéia na Unidade de Emergência. Brasil Cardiologia. Vol. 79, nº 6 (2002). p. 564-568.

VON HAFE, A. (2011). Novos biomarcadores na Insuficiência Cardíaca /Newer biomarkers in Heart Failure. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Acedido a 14 de Março 2012, em: <http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/50172/2/Novos%20Biomarcadores%20na%20Insuficiencia%20Cardaca.pdf>

WALKER, JM; RAPLEY, R. (2008) Molecular Biomethods Handbook, second edition. Humana http://books.google.pt/books/about/Molecular_Biomethods_Hand_Book.html?id=T1kY8d_G9XQC&redir_esc=y

WILD David Geoffrey - The Immunoassay Handbook, Fourth Edition: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques (2005) — ISBN-10: 0080445268 Edition: 3 Editora : ELSEVIER

WOLLERT, K.C.; DREXLER, H. - Chromogranin A in heart failure. European Heart Journal Vol.23 (2002). p. 926–927

YANES, Carmen; SANTOS-ALVAREZ, José; SÁNCHEZ-MARGALET, Victor - Pancreastatin, a chromogranin A-derived peptide, activates Gα16 and phospholipase C-β2 by interacting with specific receptors in rat heart membranes. Cellular Signalling. Vol.13, nº1 (2001). p. 43-49.

YIK WH; CHEN JW; JEN HL CHIANG MC; HUANG WP; FENG AN - Independent prognostic value of elevated high-sensitivity C-reactive protein in chronic heart failure American Heart Journal (2004), 147(5):931-938

ZATELLI Maria Chiara; TORTA Mirella; LEON Antonette; AMBROSIO Maria Rosaria; MASSIMO Gion, TOMASSETTI Paola; DE BRAUD Filippo - Chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia: an Italian Multicenter Study.

ZITELLA Andrea; BERRUTI Alfredo; DESTEFANIS Paolo; MENGOZZI Giulio; TORTA Mirella; CERUTI Carlo; Casetta Giovanni; MOSCA Alessandra; GRECO Alessandro; ROLLE Luigi - Comparison between two commercially available chromogranin A assays in detecting neuroendocrine differentiation in prostate cancer and benign prostate hyperplasia. Clinica Chimica Acta 377 (2007) 103–107.